

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Großhadern

Klinikum der Universität München

Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck

**Die CRH-Rezeptor-vermittelte Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-
Redoxsystem von Endothelzellen**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Barbara Stefanie Loupatatzis geb. Fiedler

aus

Freudenstadt

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Steinbeck
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. N. Weiss Priv. Doz. Dr. med. V. Klauss
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. U. Wilbert-Lampen
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	11.10.2007

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Atherogenese	1
1.1.1	Pathogenese der Atherosklerose	1
1.1.2	Hypothesen zur Atheroskleroseentstehung	2
1.1.2.1	Die „response-to-injury“-Hypothese	2
1.1.2.2	Die „oxidative modification“-Hypothese	2
1.2	Stress	3
1.2.1	HPA-Achse	3
1.2.1.1	Interaktionen zwischen der HPA-Achse und anderen Stresssystemen	4
1.2.1.1.1	HPA-Achse und Sympatho-Adrenomedulläres-System (SAMS)	4
1.2.1.1.2	HPA-Achse und Immunsystem	4
1.2.1.2	Dysfunktionen der HPA-Achse korreliert mit psychischen Erkrankungen	5
1.2.2	Oxidativer Stress	6
1.2.2.1	Definition und Geschichte	6
1.2.2.2	Wirkungen von oxidativem Stress auf Endothelzellen	6
1.2.2.3	Reaktive Sauerstoffspezies	7
1.3	Das GSH-GSSG-System	7
1.4	Interaktionen zwischen Atherogenese, koronarer Herzkrankheit, Stress und psychischen Erkrankungen	8
2.	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	11
3.	EXPERIMENTELL UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	12
3.1.	Charakterisierung der HMEC-1 (Humane Mikrovasculäre Endothezelllinie)	12
3.2.	CRH	12
3.3	CRH-Rezeptoren	13
3.4	Astressin	15
3.5	GSH-GSSG-System	15
3.5.1	GSH	15
3.5.2	GSSG	16
3.6	Paraquat	16
4.	MATERIALIEN	19
4.1	Zellkultur	19
4.1.1	Zelllinie	19
4.1.2	Zellkulturagenzien	19

4.1.2.1	Vollmedium	19
4.1.2.2	Ansatzmedium	19
4.1.3	Agenzien zur Analytik	19
4.1.4	Agenzien zur Reinigung	19
4.1.5	Agenzien zur Zellseparation	19
4.2	rt-Mycoplasmentest	19
4.3	Untersuchungsagenzien	20
4.3.1	Materialien zum Nachweis der mRNA des CRHR2	20
4.3.1.1	Agenzien zur RNA- Gewinnung.....	20
4.3.1.2	Agenz zur Reinigung der RNA von DNA	20
4.3.1.3	Agenzien zur Herstellung der cDNA	20
4.3.1.4	Agenzien für PCR.....	20
4.3.2	GSH-GSSG-System	21
4.3.2.1	Agenzien für die Stimulation des Systems.....	21
4.3.2.2	Agenz zur Antagonisierung des CRH2- Rezeptors	21
4.3.2.3	Agenzien zur Extraktion von GSH	21
4.3.2.4	Agenzien zur enzymatischen Messung von GSH und GSSG nach Tietze	21
4.3.3	Agenz zur Proteinbestimmung	21
4.4	Sonstige Materialien	22
4.5	Geräteliste	22
5.	METHODEN	23
5.1	Zellkultur	23
5.1.1	HMEC-1 Zelllinie	23
5.1.2	Kultivierung der HMEC-1 Zelllinie	23
5.1.3.	Zellzählung	24
5.1.4.	Vitalitätsprüfung	24
5.1.5	Endothelinbestimmung	24
5.1.6.	Mycoplasmen-Test mittels rt- PCR.....	24
5.1.6.1	Testprinzip	24
5.1.6.2	Durchführung	25
5.2	Identifizierung der CRH-Rezeptor-Subtyp 2 mRNA auf der Endothelzelle mittels PCR	25
5.2.1	RNA-Gewinnung.....	25
5.2.2	RNA-Reinigung.....	26
5.2.3	RNA-Kontrollgel	26
5.2.4	Herstellung der cDNA.....	26
5.2.5	PCR	27
5.2.6	PCR-Gel	27
5.3	Stimulationsversuche des GSH-GSSG-Systems	28
5.3.1	Standardprotokoll	28

5.3.1.1	Kinetik	28
5.3.1.2	Dosiswirkungskurven	28
5.3.2	Photometrische Messung des GSH-GSSG-Systems nach Tietze.....	29
5.3.2.1	Gesamt-Glutathion	29
5.3.2.2	GSSG	29
5.3.2.3	GSH-Konzentration.....	30
5.3.2.4	Durchführung	30
5.4	Proteinbestimmung mittels BCA-Protein-Assay	30
5.4.1	Testprinzip	31
5.4.2	Durchführung.....	31
5.5	Statistik.....	32
6.	ERGEBNISSE	33
6.1	rt-Mykoplasmen-Test	33
6.2	Nachweis von CRH-Rezeptor-Subtyp 2 mRNA in HMEC-1 Zellen	33
6.3	Ergebnisse der Stimulation des GSH-GSSG-Systems	35
6.3.1	Effekte von Paraquat auf das GSH-GSSG-System	35
6.3.1.1	Tabellarische / graphische Darstellung der Effekte.....	35
6.3.1.2	Analyse des Mengenverhältnisses (quantitativ) von GSH und GSSG unter dem Einfluss von Paraquat	39
6.3.2	Effekte von CRH auf das GSH-GSSG-System	41
6.3.2.1	Tabellarische / graphische Darstellung der Effekte.....	41
6.3.2.2	Analyse des Mengenverhältnisses (quantitativ) von GSH und GSSG unter dem Einfluss von CRH	45
6.3.3	Wirkung von Astressin auf das GSH-GSSG-System und auf dessen durch CRH-induzierte Effekte.....	46
6.3.3.1	Effekte von Astressin auf das unstimulierte GSH-GSSG-System.....	46
6.3.3.2	Effekte von Astressin auf das mit CRH stimulierte GSH-GSSG-System: Antagonisierung	50
6.3.3.2.1	<i>Tabellarisch / graphische Darstellung der Effekte.....</i>	<i>50</i>
6.3.3.2.2	<i>Analyse des Mengenverhältnisses (quantitativ) von GSH und GSSG unter dem Einfluss von CRH und Astressin.....</i>	<i>52</i>
6.3.4	Darstellung der Versuchsergebnisse im Zeitverlauf	54
6.3.4.1	Gesamt-GSH im Zeitverlauf	54
6.3.4.2	GSH berechnet im Zeitverlauf	55
6.3.4.3	GSSG im Zeitverlauf.....	56
6.4	Übersicht über die durchgeführten statistischen Tests und deren Ergebnisse.....	57
6.4.1	Überblick über die statistische Auswertung von Gesamt-GSH	57
6.4.2	Überblick über die statistische Auswertung von errechnetem GSH [GSH(b)]	59
6.4.3	Überblick über die statistische Auswertung von GSSG	61
7.	DISKUSSION	63

.....	Inhaltsverzeichnis	
7.1	Diskussion der verwendeten Methoden	63
7.1.1	HMEC-1 Endothelzelllinie.....	63
7.1.2	Tietze-Methode zur GSH-GSSG-Bestimmung.....	63
7.2	Diskussion der Ergebnisse	64
7.2.1	mRNA Nachweis für CRHR2.....	64
7.2.2	Rezeptorspezifische Wirkung von CRHR2 und CRHR1 Rezeptoren auf die Zelle.....	65
7.2.3	Paraquat	66
7.2.4	CRH	69
7.2.5	Astressin	72
7.3	Ausblick	73
8.	ZUSAMMENFASSUNG	74
9.	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	75
10.	LITERATURVERZEICHNIS	76
11.	LEBENS LAUF	89
12.	DANKSAGUNG	91

Abbildungen

Abbildung 1:	Zweidimensionale Struktur des humanen CRHR1- und CRHR2- Rezeptors.....	14
Abbildung 2:	Darstellung der Paraquattoxizität	18
Abbildung 3:	Endothelzellen in Kultur: „cell monolayer“	23
Abbildung 4:	Nachweis von CRHR2-Rezeptor mRNA in der Endothelzelle (HMEC-1)	34
Abbildung 5:	Paraquat-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 0,5 Stunden Inkubationszeit	36
Abbildung 6:	Paraquat-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 1,5 Stunden Inkubationszeit	37
Abbildung 7:	Paraquat-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 3,5 Stunden Inkubationszeit	38
Abbildung 8:	Paraquat-induziertes Mengenverhältnis von GSH zu GSSG.....	40
Abbildung 9:	CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 1,5h Inkubationszeit.....	42
Abbildung 10:	CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 0,5h Inkubationszeit.....	43
Abbildung 11:	CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 3,5h Inkubationszeit.....	44
Abbildung 12:	CRH-induziertes Mengenverhältnis von GSH zu GSSG	45
Abbildung 13:	Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 0,5h Inkubationszeit.....	47
Abbildung 14:	Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 1,5h Inkubationszeit.....	48
Abbildung 15:	Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 3,5h Inkubationszeit.....	49
Abbildung 16:	Inhibierung der CRH-induzierten Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 1,5h Inkubationszeit durch Astressin	51
Abbildung 17:	Astressin-induzierte Antagonisierung der CRH-Wirkung auf das Mengenverhältnis von GSH zu GSSG.....	53
Abbildung 18:	Gesamt-GSH im Zeitverlauf.....	54

Abbildung 19: GSH berechnet im Zeitverlauf.....	55
Abbildung 20: GSSG im Zeitverlauf.....	56

Tabellen

Tabelle 1:	Paraquat-induzierte Stimulation des GSH-GSSG-Systems	35
Tabelle 2:	CRH-induzierte Stimulation des GSH-GSSG-Systems	41
Tabelle 3:	Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System.....	46
Tabelle 4:	Antagonisierung der CRH-induzierten Effekte auf das GSH-GSSG-System durch Astressin.....	50
Tabelle 5:	Überblick über die statistische Auswertung von Gesamt-GSH.....	57
Tabelle 6:	Überblick über die statistische Auswertung von errechnetem GSH [GSH(b)]	59
Tabelle 7:	Überblick über die statistische Auswertung von GSSG.....	61

1. Einleitung

1.1 Atherogenese

Die koronare Herzkrankheit ist in den Ländern der westlichen Hemisphäre die häufigste Krankheits- und Todesursache (Stocker et al 2004). Um die Prävention ebenso wie die Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankung zu verbessern ist es wichtig, die pathophysiologischen Mechanismen der Atherogenese zu verstehen.

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft sind viele Faktoren für die Entstehung bzw. Progredienz der Atherosklerose verantwortlich. Neben prädisponierenden genetischen Faktoren (Hauser et al 2000, Granger et al 2000) sind auch Stoffwechselstörungen wie z.B. die Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus (Wassermann et al 2004, Maas et al 2003) sowie Umweltrisikofaktoren (Leone 2003, Loscalzo et al 2003) als Ursache identifiziert und etabliert. Die unterschiedlichen Risikofaktoren können dabei synergistisch wirken (Osiecki et al 2004).

1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Pathogenese der Atherosklerose ist durch eine Serie komplexer zellulärer Ereignisse charakterisiert. Im Initialstadium kommt es zur progredienten Anlagerung von Entzündungszellen an die Endothelzellwand, vermittelt durch vermehrt exprimierte Adhäsionsmoleküle (Libby 2003). Zeitgleich schütten diese Zellen Chemokine aus (Getz 2005), die zu einer Penetration der angelagerten Zellen in die Zellwand führen. Durch Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion kommt es zu einer vermehrten Permeabilität der Endothelzellschranke, wodurch vermehrt LDL intrazellulär aufgenommen und modifiziert wird. Monozyten wandeln sich in der Gefäßwand in Makrophagen um, die das modifizierte LDL aufnehmen. Durch intrazelluläre Bildung und Anhäufung von Cholesterolestern entstehen Schaumzellen, die in der Intima akkumulieren, es entstehen die sogenannten „fatty streaks“. Diese sind schon bei Kindern im Alter zwischen 10 und 14 Jahren nachweisbar (Sary 1990). Schaumzellen produzieren Zytokine und chemotaktische Faktoren, wodurch weitere Monozyten rekrutiert werden (Osterud et al 2003) mit konsekutiver Fortführung der Entzündungsreaktion. Zeitgleich sorgen von aktivierten Makrophagen ausgeschüttete Wachstumsfaktoren für folgende Effekte: Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima

mit Produktion von extrazellulärer Matrix, was zur Bildung des „fibro-fatty streaks“ führt. Durch gegenseitiges Aufrechterhalten dieser Mechanismen kommt es im Verlauf zur einer Größenzunahme der Läsion bis zur Bildung eines atherosklerotischen Plaques.

1.1.2 Hypothesen zur Atheroskleroseentstehung

Es gibt unterschiedliche Theorien zur Genese des Atherosklerose. Diese schließen sich gegenseitig nicht aus sondern ergänzen sich (Andreassi 2003). Im Folgenden sind die beiden Wichtigsten kurz erklärt.

1.1.2.1 Die „response-to-injury“-Hypothese

Die 1973 aufgestellte Theorie beschreibt als initialen Schritt der Atherogenese eine Verletzung des Endothels mit Induktion einer endothelialen Dysfunktion bis hin zur Entstehung des atherosklerotischen Plaques (Ross et al 1973, Ross 1999).

1.1.2.2 Die „oxidative modification“-Hypothese

In dieser Hypothese spielt die Modifizierung von LDL eine zentrale Rolle. Obwohl LDL in seiner ursprünglichen Form keine atherogenetischen Potenz besitzt (Stocker et al 2004), hat seine oxidierte Form proinflammatorische, immunmodulierende und zytotoxische Fähigkeiten (Steinberg et al 1999) und kann den atherogenetischen Prozess initiieren (Andreassi 2003). Es ist belegt, dass Endothelschäden, bedingt durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, das Auftreten von oxidativem Stress in Form von ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies) oder oxLDL induzieren können. Beispielhaft sei hier das Rauchen aufgeführt: Der Zigarettenrauch führt zum einen direkt zur Oxidation von LDL zu oxLDL (Harats et al 1989), das DNA-Schäden verursachen kann. Zudem vermag Zigarettenrauch gleichzeitig das DNA-Reparatursystem zu hemmen (Piperakis et al 2000), als Nettoeffekt ergibt sich eine exponentielle endotheliale Schädigung.

1.2 Stress

Jeder Organismus ist ständigem Stress ausgesetzt, welcher durch unterschiedliche Stimuli wie Feinde, veränderte Umgebungsfaktoren, Krankheit oder Verletzungen ausgelöst wird. Beim Menschen ist die Stressreaktion von besonderer Bedeutung, da zu den Stimuli, die im Tierreich zu finden sind, zusätzlich eine psychologische Belastung hinzukommt (Herman et al 1996). Nach heutigem Kenntnisstand sind viele physische Erkrankungen, beispielhaft Asthma bronchiale, Colitis ulcerosa oder arterielle Hypertonie (Chrousos 1998, Chrousos et al 1992), aber auch psychische Erkrankungen wie Depression oder posttraumatische Belastungsstörungen mit stressbedingten Auslösemechanismen behaftet (McEwen et al 1993).

1.2.1 HPA-Achse

Die HPA-Achse (Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse) ist das repräsentativste und wahrscheinlich effektivste der Systeme, die bei Bedrohung der Körperhomöostase als Abwehrmechanismen aktiviert werden (Pacak et al 2001). Weitere Abwehrsysteme sind das Sympatho-adrenomedulläre-System (SAMS), das hypothalamäre-neurohypophysäre System und das Immunsystem, wobei alle Systeme auf unterschiedlichen Ebenen miteinander interagieren (Pignatelli et al 1998). Die HPA-Achse kann durch viele Regelkreise stimuliert werden, wobei die Art des Stimulus maßgeblich daran beteiligt ist, welcher Regelkreis im konkreten Fall zur Stimulation führt (Pacak 2000). Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwischen tatsächlichen / systemischen Stressoren, die das Stresszentrum im Hypothalamus direkt aktivieren können und neurogenen Stimuli (Engelmann et al 2004). Zweitere werden zuerst durch den primären Kortex und das Limbische System verarbeitet, bevor eine dem Stressor angemessene Aktivierung der HPA-Achse erfolgt (Sawchenko et al 1996).

Die HPA-Antwort wird durch Neuronen des hypothalamischen paraventriculären Nukleus initiiert, indem diese CRH und AVP freisetzen (Aguilera et al 2000). Diese Neuropeptide werden dann zum Hypophysenlappen transportiert. Dort aktiviert CRH das Proopiomelanocortin (Black 2002), das AVP potenziert dabei die Wirkung des CRH (Plotzky et al 1993). Das Polypeptid Proopiomelanocortin wird anschließend zu ACTH gespalten, welches die Nebennierenrinde zur Produktion von Kortikosteroiden anregt (Harbuz et al 1992). Die Glukokortikoide ihrerseits wirken über negative Feedbackmechanismen auf die HPA-Achse. Dabei können sie entweder direkt auf

Höhe der Hypophyse und des Hypothalamus (Gesing et al 2001) aber auch suprahypothalär angreifen (Meany et al 1996).

1.2.1.1 Interaktionen zwischen der HPA-Achse und anderen Stresssystemen

1.2.1.1.1 HPA-Achse und Sympatho-Adrenomedulläres-System (SAMS)

Das SAMS ist das zweite wichtige System zur Initiierung einer Stressantwort. Die beiden Systeme beeinflussen sich bidirektional um somit die Anpassung des Individuums an gefährliche oder sogar lebensbedrohliche Situationen zu gewährleisten (Engelmann et al 2004). Dabei wird in der Alarmreaktion zuerst das SAMS angeregt, was zu einer Aktivierung des Sympathikus führt. Der Körper wird so in die Lage versetzt, dem Stressor aktiv (Kampf, Flucht) zu begegnen (Pedrosa 2005). Führt diese Strategie zum Erfolg, ist die Stresssituation beendet und das System kehrt in den Ruhezustand zurück (Pedrosa 2005). Sind diese aktiven Coping-Strategien (Flucht, Kampf) erfolglos, wird zusätzlich die HPA-Achse aktiviert (Pedrosa 2005). Die hormonellen Veränderungen umfassen hierbei ebenso die Anpassung der Energiebereitstellung wie auch Verhaltensänderungen wie beispielweise erhöhte Wachsamkeit, geringere Nahrungsaufnahme oder verminderter Sexualdrang. Bei schweren, auch weiterhin nicht kontrollierbaren Stimuli kann es zum Auftreten psychischer Erkrankungen kommen (Holsboer 2000). Andererseits vermag eine Aktivierung der HPA-Achse zur Erhöhung der Epinephrin- oder Noradrenalinausschüttung im ZNS und damit zur Aktivierung des Nebennierenmarks induzieren (Carrasco et al 2003).

1.2.1.1.2 HPA-Achse und Immunsystem

Für HPA-Achse und Immunsystem sind bidirektionale Interaktionen bekannt. So haben die durch die Stimulation der HPA-Achse vermehrt gebildeten Glukokortikoide die Fähigkeit auf viele Leukozytenfunktionen sowie auf Zellen des Immunsystems inhibierend zu wirken (Chrousos 1992), wodurch auch die Produktion von Zytokinen vermindert wird. Eine weitere Funktion von Glukokortikoiden ist die Triggerung von Apoptose bei T-Zellen. Parallel dazu wirken aber CRH und AVP primär immunpotenzierend und proinflammatorisch (Chrousos 1995). Die Stresshormone

können eine Akute-Phase-Reaktion auslösen, die von einer durch Erreger getriggerten Infektion nicht unterscheidbar ist (Black 2002).

Auch das Immunsystem vermag die HPA-Achse zu stimulieren. So kommt es bei Entzündungen oder Infektionen zu einer Stimulation der HPA-Achse durch Zytokinwirkung (über CRH-Neurone im Hypothalamus), wodurch das Individuum vor einer überschüssenden körpereigenen Abwehr geschützt wird (Pignatelli et al 1998).

1.2.1.2 Dysfunktionen der HPA-Achse korreliert mit psychischen Erkrankungen

Sehr viele präklinische und klinische Studien belegen, dass Systeme der Stressantwort, insbesondere die HPA-Achse, bei der Entwicklung von Depressionen, Angststörungen sowie der posttraumatischen Belastungsstörung eine wichtige Rolle spielen (Ströhle et al 2003, Gold et al 2002). Dabei scheint vor allem die bei chronischem Stress erhöhte CRH-Ausschüttung eine Schlüsselfunktion einzunehmen (Kehne et al 2002). Bei unipolarer Depression sind z.B. folgende Abnormalitäten der HPA-Achse zu erwähnen:

Erstens besteht eine Hyperaktivität des HPA-Systems, nachweisbar durch erhöhte Basiskonzentrationen von Kortisol im Plasma, zudem zeigt sich eine überschüssende Kortisolantwort auf einen ACTH-Stimulus (Jurueña et al 2004). Zweitens ist eine ausbleibende bzw. erniedrigte ACTH-Antwort auf eine zusätzlich Gabe von CRH zu beobachten (Holsboer et al 1987), was auf eine Desensibilisierung der hypophysären CRH-Rezeptoren durch Downregulation zurückgeführt wird, bestätigt durch eine verminderte Dichte an CRH-Bindungsstellen im frontalen Kortex (Holsboer et al 2000). Der Anstieg der zentralen CRH- und AVP-Ausschüttung stellt die dritte Veränderung im System dar, er ist wahrscheinlich auf einer Dysfunktion des Limbischen Systems zurückzuführen (Jurueña et al 2004).

Im Gegensatz hierzu wurde bei atypischen Depressionen eine Hypoaktivität der HPA-Achse festgestellt (Gold et al 2002). Bei Panikstörungen ist hingegen nicht eindeutig geklärt ob eine Erhöhung des Basiskortisolspiegels vorliegt, da unterschiedliche Studien differente Ergebnisse zeigten (Ströhle et al 2003). Dagegen kann auch hier eine eindeutig verminderte ACTH-Antwort auf CRH-Injektion beobachtet werden (Holsboer et al 1987).

Ein einzigartiger Fall scheint die posttraumatische Belastungsstörung (PTSD) (Überleben einer lebensbedrohlichen Situation) zu sein. Hier wird ein niedriger

peripherer Kortisolspiegel in Verbindung mit erhöhten Konzentrationen von zentralem CRH gefunden (Kasckow et al 2001). In der PTSD kommt es durch erhöhte Expression und vermehrte Sensitivität von Glukokortikoidrezeptoren zu einer veränderten Reaktion der Hypophyse auf CRH, wodurch ein deutlich verstärktes negatives Feedback entsteht (Yehuda 2001). Interessant ist, dass es einen Zusammenhang zwischen Missbrauch in der Kindheit oder frühkindlichen Stresssituationen wie Verlassenwerden und einer erhöhten Prävalenz von psychischen Erkrankungen im Erwachsenenalter gibt (Arborelius et al 1999). Dies wird darauf zurückgeführt, dass diese Erlebnisse andauernde zentrale CRH-Hypersekretion und damit eine dauerhafte Überaktivierung der HPA-Achse bewirken (Heim et al 2000).

1.2.2 Oxidativer Stress

1.2.2.1 Definition und Geschichte

1985 wurde oxidativer Stress erstmalig durch Sies als Störung der Balance zwischen pro- und antioxidativen Substanzen mit Bevorzugung der prooxidativen Seite definiert (Sies 1985). Die aktuelle, modifizierte Definition spricht von einem Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien mit vermehrtem Vorliegen von Oxidantien, was zu Schäden führen kann (Sies 1991). Diese Definition ermöglicht es, das System handlungsbezogen zu betrachten. So führt ein oxidativer Stimulus nicht automatisch zu oxidativem Stress sondern erst dann, wenn ein Anstieg der Oxidantienkonzentration mit gleichzeitigem Abfall der Antioxidantienkonzentration verbunden ist.

1.2.2.2 Wirkungen von oxidativem Stress auf Endothelzellen

Oxidativer Stress besitzt die Fähigkeit, unterschiedlichste Zellsysteme zu beeinflussen (DeNigris et al 2003). So führt er zur Inaktivierung von Stickoxid (NO), zu DNA-Veränderungen und Proteinmodifikationen. Ebenso wirkt er an der erhöhten Ausschüttung von chemotaktischen Faktoren, Zytokinen, Matrixmetalloproteinen und Adhäsionsmolekülen mit (Wassermann et al 2004), es vermag auch die Mitogenität und die Apoptose zu triggern (DeNigris et al 2003).

1.2.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Die Familie der ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies) umfasst unterschiedlichste hoch bioaktive, kurzlebige Moleküle, die aus der Reduktion von molekularem Sauerstoff stammen (Wassermann et al 2004). Im Zellstoffwechsel gibt es verschiedene Enzymsysteme, die unterschiedliche Substrate als Quelle für Elektronen benutzen und dabei eine Vielzahl von ROS wie Superoxide, Hydroxylradikale, Peroxide oder Lipidradikale produzieren (Loscalzo 2003). Daneben gibt es noch andere Quellen für ROS wie die Cyclooxygenase, das Cytochrom P450 oder den mitochondrialen Elektronentransport. Demgegenüber stehen unterschiedliche antioxidative Enzymsysteme wie die Superoxiddismutase, die Katalase oder die Glutathionperoxidase (GPX) (Fang et al 2002). Die Produktion und Elimination von ROS werden durch diese Systeme im Gleichgewicht gehalten. Sie können aber auch selbst in die Regulierung der Enzymsysteme eingreifen und so zur Entstehung von oxidativem Stress beitragen (McNally et al 2003).

1.3 Das GSH-GSSG-System

Die Aufrechterhaltung der Redox-Homeostase in der Endothelzelle wird, wie unter 1.2.2.3 bereits beschrieben, durch unterschiedliche pro- und antioxidative Systeme sichergestellt (Szasz et al 2007). Eines der wichtigsten antioxidativen Systeme ist das GSH-GSSG-System (Valko et al 2007), ein intrazelluläres Redox-System (Camera et al 2002). Dieses wirkt insbesondere Schäden entgegen, welche durch intrazellulär entstandene ROS getriggert werden wie z.B. die Lipidperoxidation (Hong et al 2005). Durch seine reduzierenden Eigenschaften gegenüber artherogenen Stoffen, wie oxLDL (oxidiertes Low-Density-Protein), Cholesterolester und Superoxide, kann das Enzym GSH-Peroxidase (GPX) diese direkt entgiften.

Zudem übt das Enzym einen indirekten Einfluss auf die Entstehung des proatherosklerotisch wirkenden $\text{NF}_{\kappa\text{B}}$ aus indem es die Anhäufung von Lipidhydroperoxidasen inhibiert, welche ihrerseits die Bildung von $\text{NF}_{\kappa\text{B}}$ induzieren. Hierbei wirkt das GSH als Radikalfänger und ist somit wichtiger Reaktionspartner bei der Entgiftung von Fremdstoffen, zudem nimmt es als Koenzym an isomerisierenden Reaktionen teil und hilft dadurch andere Oxidantien zu regulieren.

Weiterhin ist GSH wichtig für die Speicherung sowie den Abtransport von Cystein sowie für die Aufrechterhaltung des Thiolpools in der Zelle (Anderson 1997). Wird

das GSH-GSSG-System aktiviert (oxidative Stressinduktion) können die erhöhten intrazellulären GSSG-Konzentrationen NF_κB aktivieren, was neben einem proatherosklerotischen Effekt auch Einfluss auf das Immunsystem hat. Dieser wird über eine NF_κB-bedingte Erhöhung der Transkription von IL-2, TNF α , oder MHC-Antigenen vermittelt (Dröge et al 1994). Diese Interaktionen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren legen nahe, dass GSH eine pathophysiologische Rolle in der Modulation der Genexpression zukommt (Sen et al 1998, Arrigo et al 1999).

Das GSH-GSSG-System ist zudem ein wichtiger modulierender Faktor für Proteine wie z.B. membranständige Kanäle und Transporter sowie verschiedene Enzyme wie z.B. Proteinkinasen, Phosphatasen oder Transduktionsenzyme (Nakashima et al 2005, Valko et al 2007).

Des weiteren sind viele Enzyme in ihrer Funktion GSH-abhängig, hier können exemplarisch Phosphorylase, Carboanhydrase oder RAS genannt werden (Sies 1999, Pompella 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass antioxidative Systeme einerseits regulierend in die Zellproliferation einwirken andererseits aber auch auf Mechanismen der Apoptose Einfluß nehmen können (Kwon et al 2003).

Zusammenfassend ist zu postulieren, dass die GSH-GSSG-Homeostase eine bedeutende Rolle in der Endothelzellfunktion darstellt. Sie kann zudem in in-vitro Untersuchung herangezogen werden zur Quantifizierung von oxidativem Stress.

1.4 Interaktionen zwischen Atherogenese, koronarer Herzkrankheit, Stress und psychischen Erkrankungen

Zwischen der koronaren Herzerkrankung und der Depression bestehen in der Literatur gut etablierte Interaktionen (Rosengren et al 2004). So ist bekannt, dass Patienten, die unter Depression leiden, ein bis zu 4fach erhöhtes Risiko haben, einen Myokardinfarkt zu erleiden (Thomas et al 2004). Dabei scheint ein hoher Depressionsscore mit einer vermehrten Häufigkeit, einen Myokardinfarkt zu erleiden, positiv zu korrelieren (Rudisch et al 2003).

Im Umkehrschluß trifft ebenso zu, dass eine koronare Herzerkrankung zu einer erhöhten Inzidenz einer Depression führt (Pratt et al 1996); so konnte bei 17-27% der Koronarpatienten eine klinisch manifeste Depression diagnostiziert werden (Rudisch et al 2003). Zudem kann eine signifikant erhöhte Mortalität (im ersten Jahr nach Infarkt) für die Patienten beobachtet werden, die nach akutem Myokardinfarkt

depressive Symptome entwickeln (Serebruany et al 2003). Diese konkordante Beziehung zwischen Depression und koronarer Herzkrankheit bleibt auch dann bestehen, wenn man die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren mit in Betracht zieht. Demzufolge die Depression ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor (Barefoot et al 1996).

Eine der Hypothesen, die versucht, den Zusammenhang zwischen Depression und koronarer Herzkrankheit zu erklären, beruft sich auf die Wirkung der bei Depression durch Hyperaktivität der HPA-Achse erhöhten Glukokortikoidspiegel (Strike et al 2004). Dieser Hyperkortisolismus kann zu einer Erhöhung der Körperfettmasse und der freien Fettsäuren führen (Miller et al 2002), was wiederum eine Insulinresistenz bedingt, die dann ihrerseits zur Erhöhung der Körperfettmasse beiträgt (Gold et al 2002). Zudem kann die erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren zu einer Dyslipidämie mit erniedrigtem HDL beitragen (Thomas et al 2004).

Eine weitere Theorie beschreibt den proatherogenen Effekt von mentalem Stress auf eine Endotheldysfunktion (Strike et al 2004). So können die freien Fettsäuren, die auf Grund der HPA-Achsenüberfunktion entstanden sind, zu einer endothelialen Inflammation und damit zur veränderten Endothelzellfunktion führen (Gold et al 2002).

Ein weiterer möglicher Pathomechanismus ist die Aktivierung des SAMS durch mentalen Stress (Ghiadoni et al 2000). Dabei werden Katecholamine, die für eine Änderung des Blutflusses sowie eine Erhöhung des Blutdrucks durch Vasokonstriktion beitragen, freigesetzt. Kommt es durch rezidivierende Stressereignisse nicht zur Entspannung der Endothelzellen, führt dies zur Störung der endothelabhängigen Gefäßhomöostase (Strike et al 2004) und demzufolge zu Endothelschäden (Black et al 2002). Depression kann bei diesem Mechanismus als chronischer Stressor verstanden werden, so dass zunächst eine Endothelzelldysfunktion und im Folgenden eine Atherosklerose entstehen kann (Strike et al 2004).

Ein weiterer Pathomechanismus basiert auf der veränderten Endothelfunktion mit konsekutiver Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen (Black et al 2002). Zudem ist bekannt, dass Stresshormone die Entzündungsreaktion direkt triggern und verstärken können (Bierhaus et al 2003).

Durch die Hyperaktivität der HPA-Achse wird auch eine Veränderung des Blutgerinnungssystems ausgelöst, wobei die prokoagulatorischen Systeme die

Überhand gewinnen. Die progrediente Gerinnung führt zur weiteren Beschleunigung der Atherosklerose durch zunehmende Ablagerung von Fibrin in den atherosklerotischen Plaques (von Känel et al 2001). Ebenso wird eine gesteigerte Thrombozytenaktivität beobachtet (Strike et al 2004). Diese Hyperaktivität kann interessanter Weise durch den Einsatz von selektiven Serotonin- Reuptake-Hemmern, insbesondere durch Paroxetin, reduziert werden (Serebruany et al 2003).

2. Fragestellung und Zielsetzung

In der hier vorgestellten Arbeit sollte eine mögliche Einwirkung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) auf Endothelzellen untersucht werden. Verwendet wurde ein in vitro-Modell mit einer etablierten Endothelzelllinie (Humane Mikrovaskuläre Endothelzelllinie, HMEC-1).

Speziell soll untersucht werden, welche Wirkung CRH, das bei Aktivierung der HPA-Achse eine Schlüsselrolle einnimmt, auf ein Redox-Abwehrsystem der Endothelzelle hat.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das GSH-GSSG-System eine bedeutende Funktion in der Abwehr der Zelle gegenüber oxidativem Stress hat, daher wurde es in dieser Arbeit stellvertretend für ein intrazelluläres Redoxsysteme gewählt.

Zur Untermauerung einer möglichen CRH-Wirkung auf die Endothelzelle war es notwendig, die signalübermittelnden CRH-Rezeptoren auf der Endothelzelle zu identifizieren, dies erfolgte auf mRNA Ebene mittels PCR-Analyse. Antagonisierungsversuche mit Astressin, einem CRH-Rezeptor-Antagonisten, sollten untermauern, dass die beobachteten Effekte tatsächlich über endotheliale CRH-Rezeptoren vermittelt werden.

Es wurden konkret folgende Fragestellungen experimentell untersucht:

1. Auf welche Weise reagiert das GSH-GSSG-System der HMEC-1 Zellen auf durch Paraquat erzeugten oxidativen Stress (Positivkontrolle)?
2. Welche Wirkung zeigt eine CRH-Stimulation auf das GSH-GSSG-System?
3. Gibt es eine pharmakologische Wirkung von Astressin auf das GSH-GSSG-System?
4. Wird auf den Endothelzelle (HMEC-1) CRH-Rezeptor mRNA exprimiert und, wenn ja, welcher Subtyp liegt vor?
5. Wird die Wirkung von CRH auch tatsächlich über den CRH-Rezeptor vermittelt (Antagonisierungsversuche mit Astressin)?

3. Experimentell untersuchte Substanzen

3.1 Charakterisierung der HMEC-1 (Humane Mikrovaskuläre Endothelzelllinie)

Die HMEC-1 Zelllinie wurde 1992 durch Transfektion mit SV 40 als Zelllinie etabliert und verfügt über Charakteristika kleiner wie auch großer Gefäßendothelzellen (Ades et al 1992, Xu et al 1994). Sie weist morphologische, phänotypische und funktionelle Eigenschaften von humanen Endothelzellen auf und wird seither als Model für in vitro-Studien verwendet (Shao et al 2004).

In Kultur weisen HMEC-1 als Monolayer ein typisches Pflastersteinrelief auf mit einer 3-7mal höheren Dichte als nicht-immortalisierte Zellen, sie sind leicht in Kultur zu bringen und vermögen sogar im serumfreien Medium zu wachsen. Die Zellen exprimieren unter anderem endotheltypische Oberflächenmarker wie CD31, -36, -40 sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und CD44. Nach Stimulation mit Interferon kann zudem die Expression von MHC II beobachtet werden (Lidington et al 1999).

3.2. CRH

CRH ist ein zur Familie der Neuropeptide gehörendes 41 Aminosäuren-haltiges Polypeptid, das erstmals 1981 isoliert wurde (Vale et al 1981). Es entsteht durch Spaltung des Prepro-CRHs am C-terminalen Ende. Als Mediator der endokrinen, autonomen, immunologischen und psychischen Reaktion auf Stress spielt es eine zentrale Rolle in der HPA-Achse (DeSouza 1995, Kageyama et al 2002) mit Ausübung unterschiedlichster Funktionen wie z.B.: Beeinflussung des Gefäßtonus und der Gefäßneogenese (Bale et al 2002), kardialer Funktionen (Coste et al 2002), der Regelung des Essverhaltens sowie des Lernens und des Gedächtnisses (Smagin et al 2000). CRH wird zentral (paraventrikulärer Nukleus des Hypothalamus, zentraler Kern der Amygdala, Rhombencephalon) aber auch peripher (Myokard, Darm, Haut, Nebenniere, Monozyten) exprimiert (Bale et al 2004). Es besitzt eine hohe Affinität zum CRH-Bindungsprotein, das vornehmlich in der Leber gebildet und freigesetzt wird. Durch Bildung eines Dimerkomplexes (CRH / CRH-Bindungsprotein) wird die endokrine Aktivität von CRH moduliert (Lowry et al 1996).

3.3 CRH-Rezeptoren

Bekannt sind zwei CRH-Rezeptor Subtypen, CRHR1 und CRHR2, die sich in ihrem pharmakologischen Profil und in ihrer Lokalisation im Körper unterscheiden (Smagin et al 2000). Ihre DNA-Sequenz stimmt in 70% überein, in den transmembranären sowie den intrazellulären Domänen beträgt die Homologie sogar bis zu 80%. Die größten Sequenzunterschiede finden sich demzufolge in den vier extrazellulären Domänen, die vermutlich neben der N-terminalen Domäne an der Ligandenbindung teilnehmen (Eckard et al 1999). Beide Subtypen werden wiederum in mehreren Untergruppen, die unterschiedliche Splicevarianten am N-terminalen Ende darstellen, exprimiert. Für CRHR1 ist bisher ein Subtyp (CRHR1_α) identifiziert (Grammatopoulos et al 2002), während von CRHR2 bereits 3 Isoformen (CRHR2_α , CRHR2_β und CRHR2_γ) nachgewiesen wurden (Kageyama et al 2002, Kostich et al 1998), wobei die Isoformen in Bezug auf ihre Verteilung zwischen den verschiedenen Spezies differieren. Beispielhaft wurde der Rezeptor CRHR2_γ bisher nur im humanen ZNS nachgewiesen, während CRHR2_α und CRHR2_β auch bei anderen Säugern und Amphibien gefunden wurden (Lovenberg et al 1995, Kostich et al 1998). Ebenso unterscheidet sich auch die Expression der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen und deren Isoformen innerhalb einer Spezies.

CRHR1-Rezeptoren kommen primär im ZNS vor (Coste et al 2002), im Gegensatz dazu werden CRHR2-Rezeptoren neben dem ZNS [Isoformen CRHR2_α und CRHR2_γ (Coste et al 2002, Kimura et al 2002), vermehrt in der Peripherie, hier vorwiegend die Isoform CRHR2_β exprimiert (Perrin et al 1995, Stenzel et al 1995).

Trotz den zwischen den Rezeptorsubtypen und deren Isoformen bestehenden Unterschieden gehören alle CRH-Rezeptoren zur Klasse B der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Bale et al 2004). Dies bedeutet, dass sie über G_s auf die Adenylatcyclase wirken mit nachfolgender Stimulation der cAMP Produktion (Kageyama et al 2002, Eckhard et al 1999). Daneben koppeln sie in geringerem Masse an G_q , wodurch die Signalkaskade über Phospholipase C ausgelöst wird (Dautzenberg et al 2002).

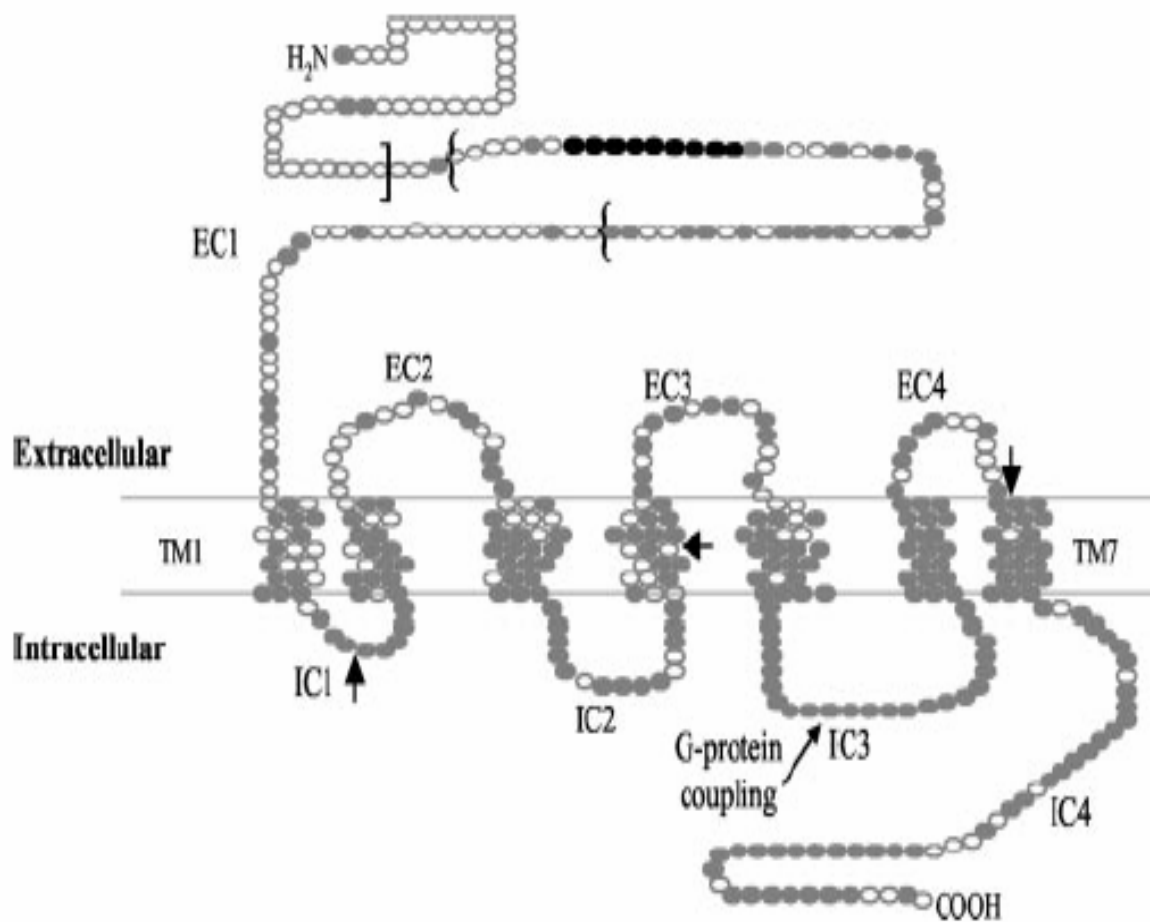


Abb.1

Die zweidimensionale Struktur des humanen CRHR1- und CRHR2-Rezeptors, die als gemeinsame „Grundstruktur“ über sieben transmembranäre Domänen verfügen (Bale et al 2004, Coste et al 2002, Eckard et al 1999).

3.4 Astressin

Um mehr Einsicht in die (patho)-physiologische Funktion von CRH zu gewinnen wurden CRH-Antagonisten durch Depletion der CRH Sequenz am N-terminalen Ende entwickelt (Gulyas et al 1995). Astressin {cylo(30-33)[D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³⁰, Lys³³]r/h CRH(12-41)} ist ein spezifischer peptidischer Antagonist von CRH (Broadbear et al 2004), dessen Struktur auf hCRH basiert (Rivier et al 2002) und der erstmalig 1994 synthetisiert wurde (Miranda et al 1994). Astressin verfügt über die gleiche Affinität zu den beiden CRH-Rezeptor-Subtypen R1 und R2, einschließlich deren bisher bekannten Splicevarianten (Broadbear et al 2004). Die hohe Affinität zum CRH-Rezeptor ist bei Astressin unabhängig von der Kopplung des Rezeptors an ein G-Protein, so dass auch freie Rezeptoren erkannt werden (Brauns et al 2001). Der genaue Wirkmechanismus von Astressin am Rezeptor ist komplex und noch nicht vollständig entschlüsselt, es ist jedoch wahrscheinlich, dass kein kompetitiver Mechanismus vorliegt. Die Antagonisierung ist dosisabhängig, zudem besitzt Astressin eine geringe intrinsische Aktivität (Brauns et al 2001).

3.5 GSH-GSSG-System

Das GSH-GSSG-System hat, wie bereits unter 1.3 beschrieben, vielfältige Aufgaben und Wirkungen in Endothelzellen (Dickinson et al 2002). Der Ablauf der Redoxreaktion ist wie folgt:

Bei Aktivierung (oxidative Stressinduktion) wird der reduzierte Anteil, das Gluthation (GSH), über das Enzym GSH-Peroxidase (GPX) zu Glutathiondisulfat (GSSG) oxidiert. Anschließend kann GSSG von dem Enzym Glutathionreduktase (GR) wieder zu GSH reduziert werden, dieser Teil der Reaktion ist NADPH abhängig (Camera et al 2002) (siehe unten aufgeführte Abbildung 2).

3.5.1 GSH

GSH (Glutathion) ist ein intrazellulär synthetisiertes Tripeptid (Meister 1974, Tietze 1969), das im Zytosol, im Zellkern sowie in den Mitochondrien nachgewiesen werden kann, wobei die höchste intrazelluläre GSH-Konzentration in den Mitochondrien vorliegt. Der GSH-Plasma- und Kernpool stehen in Verbindung, so dass ein Austausch zwischen beiden Kompartimenten möglich ist (Söhderdahl et al 2003).

Der intrazelluläre Gehalt von GSH wird durch einen negativen Feedbackmechanismus konstant gehalten, welcher auf einer Synthesehemmung des GSH durch Inhibition des spezifischen Enzyms L- γ -glutamyl-L-cysteine-Synthetase beruht (Camera et al 2002).

3.5.2 GSSG

GSSG (Glutathiondisulfid) wird durch enzymatische Oxidation von GSH durch GPX gebildet, wobei zwischen zwei GS• Radikalen eine Disulfidbrücke gebildet wird (Camera et al 2002). Das so entstandene GSSG wird entweder sofort durch die Glutathionreduktase (GR) zu GSH rückreduziert oder aktiv durch die Plasmamembran aus der Zelle ausgeschleust. Daher ist die Basiskonzentration von GSSG intrazellulär nur ca. 1% der GSH Konzentration, sie kann jedoch in subzellulären Kompartimenten, insbesondere in den Mitochondrien, auf einen Anteil von bis zu 25% ansteigen (Lenton et al 1999). Die Steigerung der GSSG Konzentration gilt als physiologischer Indikator für die Systemaktivierung gegen oxidativen Stress (ROS), da die Zunahme der GSSG-Konzentration proportional zur „Entgiftungsaktivität“ des Systems ist (Camera et al 2002).

3.6 Paraquat

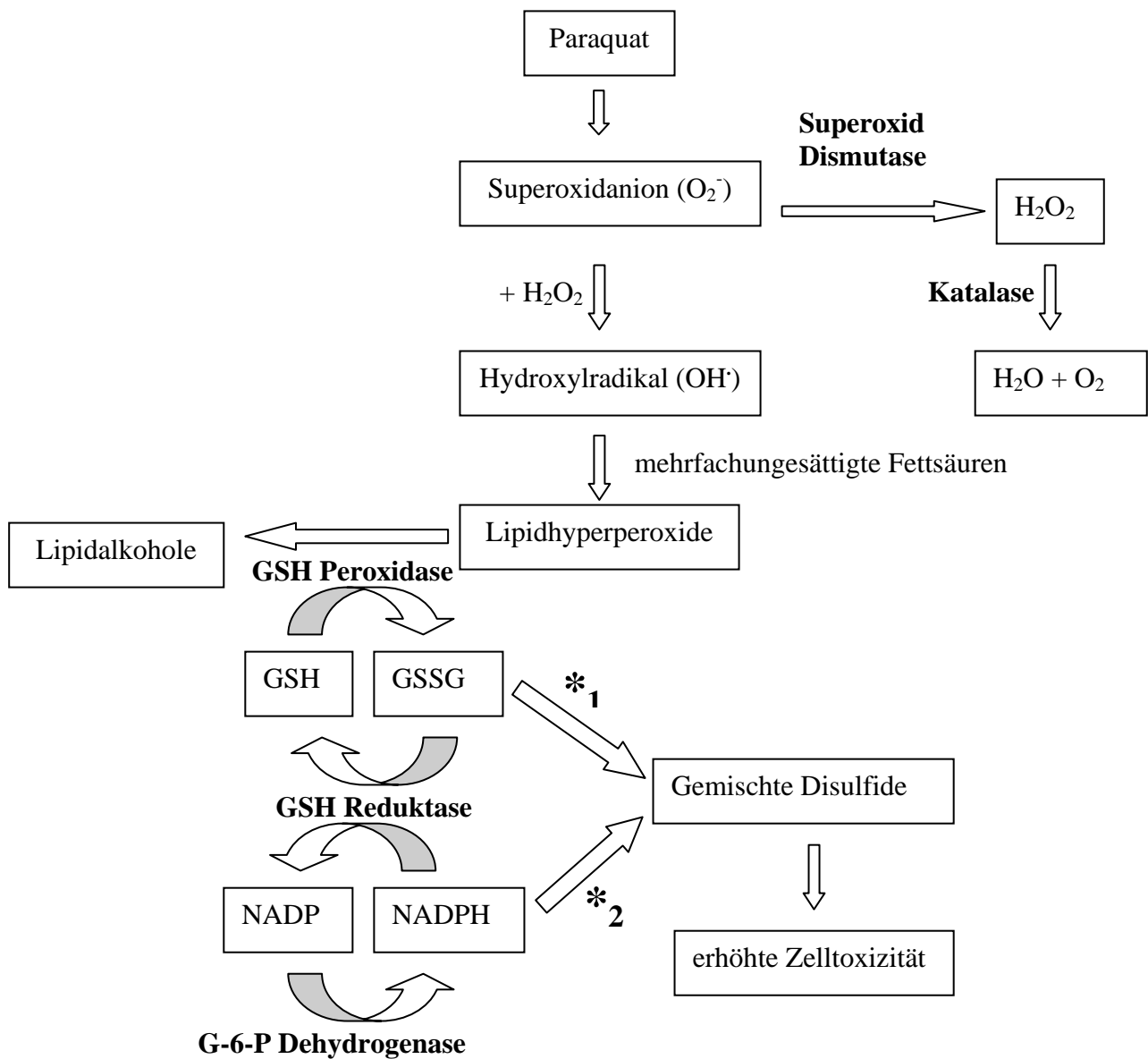
Paraquat stellt als quartäre Ammoniumbiperidylverbindung ein Zellgift dar, das als Breitspektrum-Herbizid früher weite Verbreitung fand (Bus et al 1984). In der Forschung wird Paraquat als Induktor von oxidativem Stress verwendet und stellt somit ein in vitro-Modell zur Untersuchung toxischer oxidativer Prozesse dar (Takenaka et al 2003).

Die Wirkung von Paraquat wird hauptsächlich über zwei Mechanismen vermittelt (Suntres et al 2002):

Zum Einen durchläuft Paraquat intrazellulär einen Redoxkreislauf, der zur Bildung von Superoxidanionen führt (Margolis et al 2000). Durch weiterführende Reaktionen der Anionen kommt es im Folgenden zur Entstehung von stark reaktiven Sauerstoffspezies (z.B.: Hydroxylradikale, Hydrogenperoxid), welche hochreaktiv gegenüber zellulären Makromolekülen ihre zerstörerische Wirkung entfalten (z.B. mittels Lipidperoxidation) (Tsukamoto 2002).

Zum Zweiten oxidiert Paraquat NADPH, das die größte Quelle an Redoxäquivalenten in der Zelle darstellt. Es kommt zur signifikanten Verminderung der NADPH Konzentration (Tsukamoto 2002), wodurch viele auf NADPH basierende biochemische Prozesse gestört werden (Keeling et al 1982). Die Aktivierung des GSH-GSSG-Systems mit vermehrt vorliegendem oxidiertem Anteil (GSSG) im Zusammenspiel mit der durch Paraquat verminderten NADPH-Konzentration führt zur Bildung von gemischten Disulfiden, die wiederum Veränderungen in der Aktivität wichtiger Sulfonylgruppen-enthaltender Enzyme bedingen, was schließlich die Zelltoxizität bedingt.

Der Körper besitzt mehrere Abwehrmechanismen um der Entstehung von oxidativem Stress (ROS) und den daraus resultierenden Schäden entgegen zu wirken. Hierzu gehören die Superoxiddismutase, die Katalase, das GSH-GSSG-Redoxsystem sowie das NADPH-NADP-Redoxsystem.



*₁ GSSG durch Paraquat vermehrt gebildet

*₂ NADPH durch Paraquat vermindert gebildet

Abb.2:

Darstellung der Paraquattoxizität durch oxidative Prozesse sowie zelluläre Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress.

4. Materialien

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zelllinie

HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells)

→ Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA

4.1.2 Zellkulturagenzien

4.1.2.1 Vollmedium

15% Fetales Kälberserum, FCS → Fa. PAA, Linz, Austria

Gentamycin 40mg/ml → Fa. Ratiopharm, Ulm/ Blaubeuren, D

L-Glutamin (200mM) → Fa. Biochrom, Berlin, D

MCDB 131 ohne L-Glutamin → Fa. ccpro, Neustadt/ W., D

4.1.2.2 Ansatzmedium

1% Fetales Kälberserum, FCS → Fa. PAA, Linz, Österreich

Gentamycin 40mg/ml → Fa. Ratiopharm, Ulm/ Blaubeuren, D

L-Glutamin (200mM) → Fa. Biochrom, Berlin, D

MCDB 131 ohne L-Glutamin → Fa. ccpro, Neustadt/ W., D

4.1.3 Agenzien zur Analytik

Trypanblau 0,5% → Fa. Biochrom Seromed, Berlin, D

Endothelin-Assay → Fa. Biomedica, Wien, A

4.1.4 Agenzien zur Reinigung

Phosphat-buffered Saline PBS → Fa. Gibco, Leopoldshafen, D

4.1.5 Agenzien zur Zellseparation

Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% in PBS ohne Ca/Mg → Fa. Biochrom, Berlin, D

4.2 rt-Mycoplasmentest

PCR-Mycoplasmentest Diagnostikkit → Fa. Minerva Biolabs GMBH, Berlin, D

4.3 Untersuchungsagenzien

4.3.1 Materialien zum Nachweis der mRNA des CRHR2

4.3.1.1 Agenzien zur RNA- Gewinnung

Chloroform	→ Fa. Merck, Ismaning, D
Ethanol 75%	→ Fa. Merck, Ismaning, D
Isopropanol 100%	→ Fa. Merck, Ismaning, D
Trizol- Reagenz	→ Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, D

4.3.1.2 Agenz zur Reinigung der RNA von DNA

DNA free kit	→ Fa. Ambion, Austin, USA
--------------	---------------------------

4.3.1.3 Agenzien zur Herstellung der cDNA

DNTP Mix 10mM	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgien
RNAse Out™ Recombinante Ribonuclease Inhibitor	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgien
Random- Primer	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgien

SuperScript™ Rnase H⁻ Reverse Transcriptase enthält:

DTT 0,1M	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgium
First Strand Buffer	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgium
Reverse Transkriptase	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgium
SuperScript™	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgium

4.3.1.4 Agenzien für PCR

Agarose	→ BMA, Rockland, USA
Ampli Taq Gold enthält:	
Ampli Taq Gold 5 U/μl	→ Fa. Applied Biosystems
MgCl ₂ Solution	→ Fa. Applied Biosystems
10X PCR Gold Buffer	→ Fa. Applied Biosystems
Bromphenolblau	→ Fa. Sigma, Taufkirchen, BRD
DNA Ladder 50bp	→ MBI Fermentas, USA
DNTP Mix 10mM	→ Fa. Invitrogen, Merelbeke, Belgien

Glycerin → Fa. Sigma, Taufkirchen, D

Primer Forward:

5′ - CCA CAT CCG AGA CAA TCC AGT ACA G – 3′ → Fa. Thermohybid, Ulm; D

Primer Reward:

5′ - CGA GGG GTC ACA CAG CGG C – 3′ → Fa. Thermohybid, Ulm; D

4.3.2 GSH-GSSG-System

4.3.2.1 Agenzien für die Stimulation des Systems

CRH human rat → Fa. Biotrend, Köln, D

Methyl Viologen (Paraquat) → Fa. Sigma, Deisenhofen, D

4.3.2.2 Agenz zur Antagonisierung des CRH2- Rezeptors

Astressin → Fa. Bachem, Heidelberg, D

4.3.2.3 Agenzien zur Extraktion von GSH

EDTA Tetra 5mM → Fa. Merck, Ismaning, D

K₂HPO₄ 0,1M → Fa. Merck, Ismaning, D

KH₂PO₄ → Fa. Merck, Ismaning, D

Methanol rein → Fa. Merck, Ismaning, D

NEM (N-ethylmaleimid) → Fa. Sigma, Deisenhofen, D

Propanol 70% → Apotheke Klinikum Großhadern, München, D

4.3.2.4 Agenzien zur enzymatischen Messung von GSH und GSSG nach Tietze

DTNB → Fa. Sigma, Taufkirchen, D

Gluthation Reductase → La Roche, Mannheim, D

GSH 1mM → Fa. Sigma, Taufkirchen, D

GSSG 800µM → Fa. Sigma, Taufkirchen, D

NADPH → Fa. La Roche, Mannheim, D

NaHCO₃ 0,5 → Fa. Merck, Ismaning, D

4.3.3 Agenz zur Proteinbestimmung

BCA protein Assay Reagent Kit → Fa. Pierce, Rockford, USA

4.4 Sonstige Materialien

0,2 ml Flat Cap Tubes	→ Fa. Abgene, Hamburg, D
Chromabond C 18 Kartuschen 3 ml	→ Fa. Macherey-Nagel, Düren, D
Chromabond Edelstahlkonnektoren	→ Fa. Macherey- Nagel, Düren, D
Chromabond Propylen- Tank	→ Fa. Macherey- Nagel, Düren, D
Einmalspritzen 1ml	→ Braun, Melsungen, D
Kuvetten 10x4x45mm	→ Fa. Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	→ Fa. Gilson, Middleton, USA
Zellkultur- Testplatten 12 wells	→ Fa Nunc, Wiesbaden, D
Zellkultur- Testplatten 6 wells	→ Fa. Nunc, Wiesbaden, D
Zellkulturflaschen 75cm ²	→ Fa. Bichrom, Berlin, D

4.5 Geräteliste

Chromabond Vakuum- Kammer	→ Fa. Macherey- Nagel, Düren, D
DNA Engine DYAD TM (Peltier Thermal Cyclor)	→ MJ Research
DU- 70 Spectrometer	→ Beckman
Laborfuge II	→ Heraeus- Christ
Multi CalpHmeter	→ WTW
Multiscan MCC/340	→ Titertek
Neubauer-Zählkammer	→ Fa. Sigma, Deisenhofen, D
RCT basic	→ IKA Labortechnik
Thermomixer comfort	→ Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer compact	→ Eppendorf, Hamburg, D
Vortex-Genie	→ Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 3200	→ Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5417 R	→ Eppendorf, Hamburg, D

5. Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 HMEC-1 Zelllinie

Zur Durchführung der Experimente wurde die 1992 etablierte humane Endothelzelllinie HMEC-1 verwendet.

5.1.2 Kultivierung der HMEC-1 Zelllinie

Die tiefgefrorenen Zellen wurden laut Protokoll unter sterilen Bedingungen im Vollmedium erwärmt. Nach 24stündiger Kultivierung bei 37° C im Inkubator, mit einem Anteil von 5% CO₂ in der Atmosphäre, wurden die Zellen erstmalig passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mittels 2ml Trypsin gespült. Zum Ablösen der Endothelzellen wurden erneut 2ml Trypsin zugegeben und die Zellen für 10 Minuten trypsinisiert. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 5ml Vollmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde mittels Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 1200U zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Vollmedium resuspendiert. Aus der ersten Zellpassage wurden Aliquots abgefroren und die restlichen Zellen mit einer Zellzahl von 3×10^5 in Vollmedium erneut kultiviert. Nach 48 bis höchstens 72 Stunden erfolgte eine erneute Zellpassage. Bei jeder Passage wurden die Zellkulturen lichtmikroskopisch auf Vitalität kontrolliert.

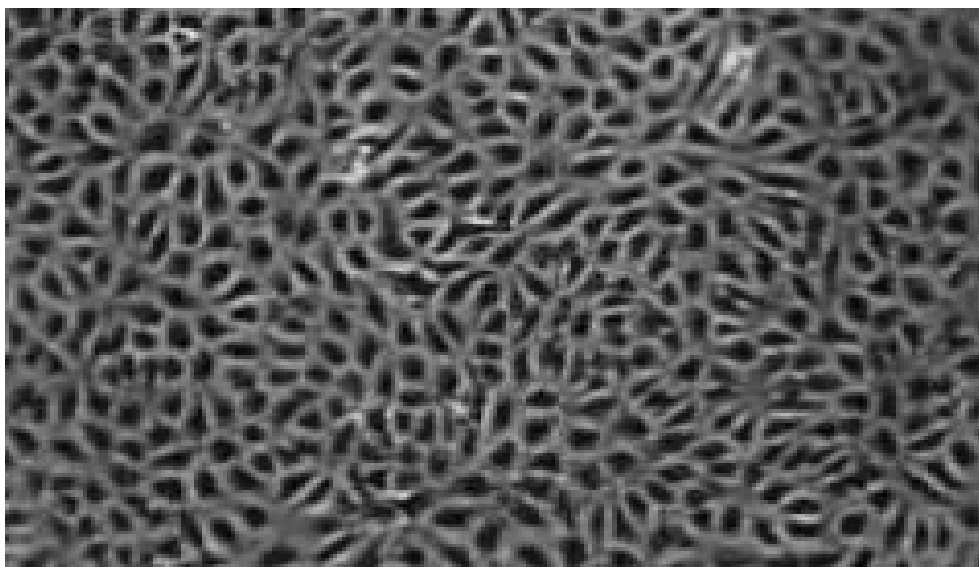


Abb. 3:

Endothelzellen in Kultur: charakteristisches Pflastersteinrelief der „cell monolayer“

5.1.3. Zellzählung

Die Auszählung der Zellen erfolgte mittels Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop.

5.1.4. Vitalitätsprüfung

Zunächst wurde die Intaktheit der „cell monolayer“ visuell unter dem Lichtmikroskop überprüft. Anschliessend wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Bei intakter Zellmembran nehmen Zellen kein Trypanblau auf, eine intrazelluläre Blaufärbung weist hingegen auf eine Schädigung der Membran als Marker des Zelltodes hin.

Die zu untersuchende Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und 5 Minuten inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf eine Neubauerzählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop der Anteil der intrazellulär gefärbten Zellen ermittelt, welcher in allen Versuchen (bei intaktem Monolayer) stets unter 5% betrug.

5.1.5 Endothelinbestimmung

Endothelin-1 wurde mit Hilfe eines etablierten ELISA-Tests laut Testprotokoll quantitativ bestimmt.

5.1.6. Mycoplasmen-Test mittels rt- PCR

5.1.6.1 Testprinzip

Mit dem Test können in Zellkulturen typischerweise vorkommende Kontamination mit unterschiedlichen Mykoplasmaspezies, einschließlich *Acholeplasma laidlawii* sowie verschiedene Ureaseplasmapezies nachgewiesen werden.

Der verwendete Test ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf der Basis einer Polymerase-Kettenreaktion. Hierbei wird ein Abschnitt der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms vervielfältigt. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 270 bp und kann im Agarosegel direkt sichtbar gemacht werden. Dem Testsystem ist eine interne Kontrolle beige-fügt, die bei einer erfolgreich durchgeführten PCR ein ca. 191 bp großes Produkt ergibt. Die Bande der internen Kontrolle erscheint im Agarosegel kurz unterhalb der Bande einer Mykoplasmen-positiven Probe. Die Nachweisgrenze des Tests liegt bei 1-5 fg Mykoplasmen DNA, das entspricht 2-5 Mykoplasmen pro Probenvolumen (2µl).

5.1.6.2 Durchführung

Der Mykoplasmentest wurde unter Verwendung des VenorGeM^R-Mykoplasmen-Diagnostik-kits durchgeführt. Hierfür wurden zuerst 100µl Probenmaterial in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde für 5 Minuten erhitzt, um im Testmaterial enthaltene Mykoplasmen zu lysieren und DNAsen zu deaktivieren. Anschließend wurden die Proben 5 Sekunden bei 13 000U zentrifugiert, um störende Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend erfolgte die Herstellung eines Reaktionsmix laut Protokoll. Jeweils 48µl PCR-Reaktionsmix wurden dann mit 2µl Probe vermischt, kurz zentrifugiert und in den Thermozykler gegeben. Das Thermozykler-Programm wurde laut Testprotokoll durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben wurde jeweils eine Positivkontrolle (48µl Reaktionsmix+2µl interne Kontrolle) sowie eine Negativkontrolle (48µl Reaktionsmix+2µl steriles, deionisiertes Wasser) verwendet. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 1,5% Agarosegels aufgetrennt. Pro PCR-Reaktionsansatz wurden 5µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 90mV durchgeführt, die Banden anschließend photographiert und ausgewertet.

5.2 Identifizierung der CRH-Rezeptor Subtyp 2 mRNA auf der Endothelzelle mittels PCR

5.2.1 RNA-Gewinnung

HMEC-1 Zellen wurden in einen 75ccm Flask passagiert und dort 78h inkubiert. Dann wurde das Trizolreagenz laut Trizolprotokoll (1ml Trizol/10ccm) hinzugegeben und 7min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Trizol-Zellengemisch in RNA-Eppendorfgefäße gefüllt, wobei jedes Eppendorfgefäß ein Füllvolumen von 1ml hatte. Pro Eppendorfgefäß wurden 200µl Chloroform zugegeben und anschließend der Inhalt mittels Vortex solange vermischt, bis eine milchige Emulsion entstand. Diese wurde 2-3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 15 Minuten in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge mit 11900G zentrifugiert. Die ca. 70µl wässrige Phase wurden entnommen und in ein neues RNA-Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden 500µl Isopropanol zugegeben und durch vorsichtiges Kippen von Hand gemischt. Erneut wurden die

Eppendorfgefäße 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4°C und 11900G nun für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt. Pro Eppendorfgefäß wurde nun 1ml 75% Ethanol zugegeben, gemischt und 5 Minuten bei 4°C und 7500 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Eppendorfgefäße 12-15 Minuten auf Löschpapier zum Trocknen ausgelegt bevor auf jedes Pellet je 20µl autoklaviertes Aqua bi dest gegeben wurde.

5.2.2 RNA-Reinigung

Das RNA-Gemisch aus 5.2.1 wurde mit DNase-Puffer (10% Volumenanteil des Gesamtvolumens) und 2µl DNase versetzt. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für 50 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert. Das Inaktivierungsreagenz wurde laut Vorschrift vorbereitet, ebenfalls mit einem Volumenanteil von 10% des Gesamtvolumens zugegeben, gemischt und die Proben erneut 1-2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde nun 1µl entnommen und mit 149µl RNA free water in die Bestimmungskuvette gegeben.

5.2.3 RNA-Kontrollgel

Für das RNA-Kontrollgel wurden 0,4g Agarose und 40ml TBE Puffer gekocht. Nach kurzem Abkühlen wurden 0,3µl 1% Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen. Anschließend ließ man das Gel für 20-30 Minuten auskühlen. Während dessen wurden die Proben vorbereitet. Pro Probe wurden 500ng RNA (entspricht: 2µl RNA), 4µl RNA-Wasser und 4µl Formamidaufragspuffer in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die gesamten 10µl/Probe wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 90 V gestartet. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

5.2.4 Herstellung der cDNA

Der gesamte Arbeitsschritt fand unter sterilen Bedingungen (Flow) und auf Eis statt. Zuerst wurden 1µl Random Primer, 2µl RNA und 5µl dNTP-Mix (2mM) mit 4µl PCR-Wasser (aqua injectabile) zusammenpipettiert. Anschließend wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 65°C in den PCR-Cycler gegeben. Daraufhin wurden die Proben sofort

auf Eis gestellt und kurz anzentrifugiert. Es wurden pro Probe 4µl 5x-First-Strand-Buffer, 2µl 0,1M DTT, 1µl RNase out Recombinant Ribonuclease inhibitor (40U/µl) und 1µl Super Script (200 units) zugegeben und gemischt. Erneut wurden die Proben in den PCR-Cycler gegen und dort 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert.

5.2.5 PCR

Auch hier wurde der gesamte Arbeitsschritt unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zuerst wurden die benötigten Gerätschaften (Pipetten, Pipettspitzen, Eppendorfgefäße) 15 Minuten unter UV- Licht bestrahlt. Dann wurde ein Mastermix hergestellt der pro Probe 35,5µl Wasser, 5µl 10x-PCR-Puffer, MgCl₂ 25mM 2µl, dNTP 40µM 5µl, Primer CRF2 Forward 1µl, Primer CRF2 Reward 1µl und Taq Polymerase 2,5U/ml 0,5ml enthält. Je 49µl Mastermix wurden mit 1µl cDNA versetzt und in den PCR-Cycler gegeben und das PCR-Programm wie folgt gestartet: Erhitzen der Proben auf 95°C für 1 Minute, 95°C für 30 sec, 61,3°C für 30 sec, 74°C für 30 sec, insgesamt 35. Das Programm endete mit 1x 74°C für 5 Minuten.

5.2.6 PCR-Gel

Zur Herstellung des PCR-Gels wurden 0,68g Agarose mit 40ml 1x TBE-Puffer vermischt, kurz aufgekocht und mit Ethidiumbromid versehen. Das Gel wurde in die Gelkammer gegossen und für 30 Minuten abgekühlt. Währenddessen wurden die Proben sowie ein DNA-Ladder nach folgenden Pipettierschemata vorbereitet.

DNA-Ladder: 1µl Maker, 4µl H₂O, 5µl Loading Dye

Proben: 10µl Probe, 10µl Loading Dye

Die vorbereiteten Proben und der DNA-Ladder wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 90V für 40 Minuten gestartet. Anschließend wurde das Gel entnommen und unter UV-Licht betrachtet. Die Banden wurden photographiert und ausgewertet.

5.3 Stimationsversuche des GSH-GSSG-Systems

5.3.1 Standardprotokoll

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in 15%igem Vollmedium ausgesäht und 48 Stunden inkubiert. Danach wurde das 15%ige Medium durch 1%iges Vollmedium ersetzt und nochmals 1h inkubiert mit anschließender Zugabe der Testsubstanzen (CRH, Paraquat, Astressin). Der Anteil von CO_2 in der Atmosphäre betrug während der gesamten Zeit 5%.

Die mit Paraquat stimulierten Proben dienten als Positivkontrollen, die unstimulierten Proben (Medium 1%) als Negativkontrollen. Den Ergebnissen der Kinetikversuche folgend fand die Probenentnahme jeweils nach 0,5h, 1,5h und 3,5h statt.

5.3.1.1 Kinetik

Es wurde eine Kinetik mit Beobachtungszeiträumen von 0 bis 6 Stunden mit gestaffeltem Messintervall erstellt. Hierzu wurde eine Paraquatkonzentration von 10^{-4}M verwendet. Nach 6 Stunden in dieser Konzentration war der Anteil der vitalen Zellen nicht mehr konstant über 95% und die Monolayer teilweise nicht mehr vollständig intakt.

5.3.1.2 Dosiswirkungskurven

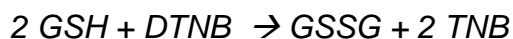
Die Bestimmungen wurden nach Inkubation bei oben genannten Bedingungen von 0,5h, 1,5h sowie 3,5h durchgeführt. Untersucht wurde Paraquat in den Konzentrationen 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , 10^{-6}M sowie CRH in den Konzentrationen 10^{-5}M , 10^{-6}M und 10^{-7}M . Bei den verwendeten Paraquat-Konzentrationen von 10^{-4}M , 10^{-5}M und 10^{-6}M sowie bei allen eingesetzten CRH-Konzentrationen betrug der Anteil der vitalen Zellen (nach Trypanblaufärbung) konstant jeweils >95% der Zellpopulation. Bei einer Paraquatkonzentrationen von 10^{-3}M zeigte sich hingegen eine Auflösung des Zellmonolayer und der Anteil der vitalen Zellen betrug <95%.

5.3.2 Photometrische Messung des GSH-GSSG-Systems nach Tietze

5.3.2.1 Gesamt-Glutathion

Die Summe des oxidierten Glutathiondisulfid (GSSG) und des reduzierten Glutathion (GSH) wurde durch einen kinetischen Test bestimmt. Dieser basiert auf der Methode nach Tietze (Tietze 1969).

Die Grundlage für diese photometrische Messung stellt die folgende Reaktion dar:



Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme der nichtenzymatischen Reduktion von 5,5-DTNB durch GSH wurde über einen Zeitraum von 6 Minuten in 60-sekündigem Abstand bei 412 nm aufgezeichnet. Durch die zeitgleich von der Glutathionreduktase enzymatisch vermittelte Reduktion von GSSG konnte die Reaktionsgeschwindigkeit der DTNB-Reduktion konstant gehalten werden. Der hierfür verwendete Testansatz enthält:

800µl Phosphatpuffer (pH 7,4)

50µl NADPH (5mM)

50µl DTNB (1 mM)

20µl GR (24 U/ml)

50µl Probe

Vor jeder Messung wurde eine GSH-Standardkurve ermittelt.

5.3.2.2 GSSG

Um die Konzentration des GSSG bestimmen zu können, muss die Autooxidation des GSH zu GSSG verhindert werden. Hierzu wurde die von Lauterberg beschriebene Methode der Konjugation des GSH mit NEM verwendet (Lauterberg et al 1984). In einer spontanen Reaktion zwischen GSH und NEM entsteht ein stabiler Komplex, welcher die Teilname des reduzierten GSH an der Reaktion effektiv verhindert. Da das überschüssige NEM jedoch den folgenden kinetischen Test nach Tietze verfälschen kann, wurde dieses mittels eines Trennverfahrens über Vakuumkartuschen eliminiert. Hierzu wurden die Kartuschen mit 10ml Methanol

100% und 10ml Aqua bi dest vorbereitet. Anschließend wurden 500 µl NEM Perfusat aufgetragen und mit Phosphatpuffer eluiert. Die NEM-freien Eluate wurden dann nach der Tietze-Methode bestimmt. Die GSSG-Wiederfindung betrug hierbei 94%. Um das GSSG zu bestimmen wurde die NADPH-Oxidation bei 340nm ebenfalls über einen Zeitraum von 6 min in 60-sekündigem Abstand gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2µl GR gestartet.

5.3.2.3 GSH-Konzentration

Die Konzentration des GSH wurde aus der Differenz zwischen der gemessenen Gesamt-Glutathionkonzentration und der Glutathiondisulfidkonzentration mittels nachstehender Formel

$GSH = c(\text{Gesamt-GSH}) - c(\text{GSSG})$ berechnet.

5.3.2.4 Durchführung

Zuerst wurde nach der entsprechenden Inkubationszeit (0,5h, 1,5h, 3,5h) das Medium sorgfältig abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet mit 1 ml H₂O bi dest lysiert und das Lysat in Eppendorfgefäße pippetiert und zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 300 µl des Überstandes für die GSH-Gesamt-Messung und für die GSSG-Messung in neue Eppendorfgefäße überführt. In das Eppendorfgefäß für die GSSG-Messung wurden vorher bereits 300µl NEM gegeben. Die Eppendorfgefäße wurden 1 min zentrifugiert, um die Mischung von NEM und GSH zu gewährleisten. Die Proben für die GSSG-Messung wurden direkt im Anschluss (wie oben beschrieben) eluiert und bei -60°C eingefroren.

Die Gesamt-GSH-Bestimmung sowie die GSSG-Bestimmung wurden zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Nach Tietze wurde die Summe des Gesamt-GSH sowie die Menge an GSSG jeweils photometrisch bestimmt. Die Menge des GSH wurde anschließend rechnerisch mittels Subtraktion des GSSG-Wertes vom Gesamt-GSH-Wert ermittelt.

5.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Protein-Assay

Um die ermittelten Messdaten der unterschiedlichen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels

BCA-Protein-Assay bestimmt. Die in 5.3 ermittelten Konzentrationen an GSH und GSSG wurden auf 100µg Protein bezogen.

5.4.1 Testprinzip

Der BCA-Protein-Assay basiert auf einer kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung von Gesamtprotein. Die Methode kombiniert die Biuretreaktion mit der hochsensitiven und selektiven kolorimetrischen Bestimmung des Kupferkations durch BCA. Das bei dieser Reaktion entstandene violette Reaktionsprodukt wird durch einen Chelatkomplex, der aus zwei BCA-Molekülen mit einem Kupferion besteht, gebildet (Smith et al 1985). Dieser wasserlösliche Chelatkomplex weist eine deutliche optische Dichte bei 562nm auf, die in weiten Bereichen (20-2,000µg/ml) mit der steigenden Proteinkonzentration annähernd linear verläuft.

5.4.2 Durchführung

Zuerst wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/µl) nach dem Assay-Protokoll erstellt. Die im Assay enthaltenen Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50:1 vermischt (Arbeitslösung). Anschließend wurden die BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration und die zu testenden Proben separat auf eine 96 well Platte mit einem Volumen von jeweils 25µl/well pipettiert. Bei den BSA-Lösungen wurden Doppelbestimmungen, bei den Proben Dreifachbestimmungen vorgenommen. Jedem well wurden 200µl der Arbeitslösung zugegeben, so dass das Verhältnis zwischen Probe und Arbeitslösung 1:8 betrug. Die Platte wurde verschlossen und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und die Extinktion der einzelnen wells bei einer Wellenlänge von 562nm im Elisareader gemessen. Es wurden die Mittelwerte der Mehrfachbestimmungen errechnet. Anschließend wurde eine Standardkurve aus den Mittelwerten der BSA-Verdünnungsreihe erstellt, anhand dieser Standardkurve wurden die mittleren Extinktionswerte der zu testenden Proben in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

5.5 Statistik

Quantifiziert wurden Mittelwert und Standardabweichungen. Die Berechnung des Signifikanzniveaus erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 und WINSTAT, die Normverteilung wurde mittels Kolmogorow-Smirnov-Test ermittelt. Normverteilung besteht definitionsgemäß wenn $P > 0,05$ und $D_{\text{errechnet}} < D_{\text{kritisch } 0,05}$. Die Unterschiede zwischen den Versuchs- und den Kontrollgruppen wurden bei Normverteilung der Daten über den Student's-t-Test analysiert.

Zur Adaptation des kritischen Signifikanzniveaus an kleine Fallzahlen wurde zusätzlich die Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Dabei wurde ein globales Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

6. Ergebnisse

6.1 rt-Mykoplasmen-Test

Es konnte gezeigt werden, dass in der zur Durchführung der Versuche verwendeten Endothelzellkultur (HMEC-1) keine Verschmutzung mit Mykoplasmaspezies, *Acholeplasma laidlawii* oder mit Ureaseplasmaspezies vorlag.

6.2 Nachweis von CRH-Rezeptor-Subtyp2 mRNA Nachweis in HMEC-1 Zellen

Der Nachweis der CRHR2 mRNA wurde mittels PCR durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer waren für diesen Subtyp spezifisch, wurden jedoch so gewählt, dass alle 3 Splicevarianten des CRHR2 miterfasst werden konnten. Somit war es nicht möglich, die spezifischen CRHR2-Isoformen (α , β , γ) zu differenzieren. Als Positivkontrolle wurde die THP-1-Zelllinie (etablierte Monozytenzelllinie), bei der die mRNA des CRHR2 bereits bestätigt war, verwendet. Als Negativkontrolle wurde DNA-freies Aqua injectabile eingesetzt.

Während der Subtyp 2 auf den HMEC-1 nachgewiesen werden konnte, fanden wir keinen Hinweis auf das Vorhandensein des Subtyp 1.

(Der Nachweis des CRHR2-Rezeptors auf Proteinebene wurde ausserhalb dieser Dissertation mittels FACS-Analyse von unserer Arbeitsgruppe erbracht).

Nachweis von CRHR2-Rezeptor mRNA in der Endothelzelle (HMEC-1)

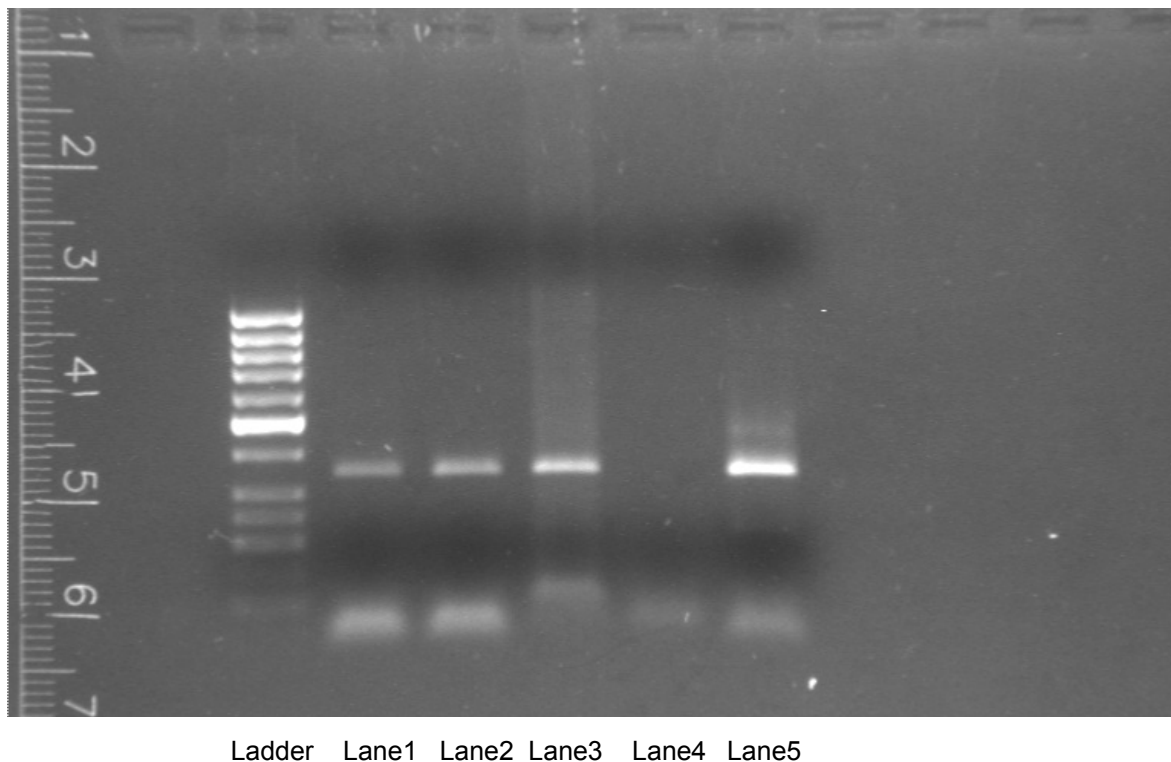


Abb.4

Ladder 50bp

Lane 1: HMEC-1 stimuliert mit CRH 10^{-7} M

Lane 2: HMEC-1 unstimuliert

Lane 3: THP-Zellen unstimuliert (nicht Teil dieser Dissertation)

Lane 4: Negativkontrolle, DNA-freies Aqua injectabile

Lane 5: Positivkontrolle: THP-1, CRHR2- Sequenz durch Fa. Medigenomix bestätigt

Die ermittelte CRHR2-Bande lag exakt auf der gleichen Höhe wie die Bande der Positivkontrolle während die durchgeführte Negativkontrolle, wie erwartet, keine Bande zeigte.

Das PCR-Produkt der HMEC-1 (Lane 2) wurde anschließend von der Firma Medigenomix durch Sequenzierung als CRHR2 bestätigt.

6.3 Ergebnisse der Stimulation des GSH-GSSG-System

6.3.1 Effekte von Paraquat auf das GSH-GSSG-System

6.3.1.1 Tabellarische / graphische Darstellung der Effekte

Die intrazelluläre Reaktion von Paraquat führte zu signifikanten Veränderungen im GSH-GSSG-System. Nach Inkubation (0,5h) mit Paraquat in der Konzentration 10^{-4} M zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Gesamt-GSH und des errechneten GSH (*Gesamt-GSH – GSSG*) bei nicht signifikant verändertem GSSG.

Eine Inkubation mit Paraquat (10^{-4} M) nach 1,5 und 3,5 Stunden und Stimulation mit Paraquat in der Konzentration 10^{-5} M zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen des GSH-GSSG-Systems im Vergleich zur Kontrolle (nicht stimulierte Zellen).

Paraquat-induzierte Stimulation des GSH-GSSG-Systems									
0,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko
MW	8,8619	7,3464	5,4367	8,0033	6,558	4,6762	0,6753	0,7884	0,9072
STABW	4,6495	1,8481	2,4058	4,5848	1,6813	2,5792	0,3137	0,4203	0,3571
p-Wert	0,0033*	0,047		0,0043*	0,0609		0,0792	0,4324	
n	14	8	27	14	8	28	10	8	27
1,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko
MW	6,3345	7,1856	6,0229	5,4392	6,3831	5,1142	0,8953	0,8025	0,9088
STABW	1,7412	0,7335	2,0996	1,8699	0,7678	2,0602	0,2407	0,2889	0,3334
p-Wert	0,6575	0,1374		0,6449	0,1006		0,9008	0,4236	
n	12	8	26	12	8	26	12	8	26
3,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko	P ⁻⁴ M	P ⁻⁵ M	Ko
MW	7,2606	7,4875	6,1299	6,1429	6,483	5,1486	0,7207	1,0046	1,0557
STABW	2,831	2,6069	1,915	3,2591	2,8109	1,9754	0,1759	0,6425	0,66
p-Wert	0,1413	0,1173		0,2862	0,1514		0,0833	0,8506	
n	14	8	26	10	8	23	13	8	23

Tab.1:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Paraquat (P)-induzierten Stimulation des GSH-GSSG-Systems. Es sind jeweils Mittelwert (MW), Standardabweichung (STABW), Signifikanzwert (p) und Anzahl der Versuche (n) angegeben. Signifikante Werte wurden durch Kursivschrift und (*) gekennzeichnet.

Paraquat-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 0,5h Inkubationszeit

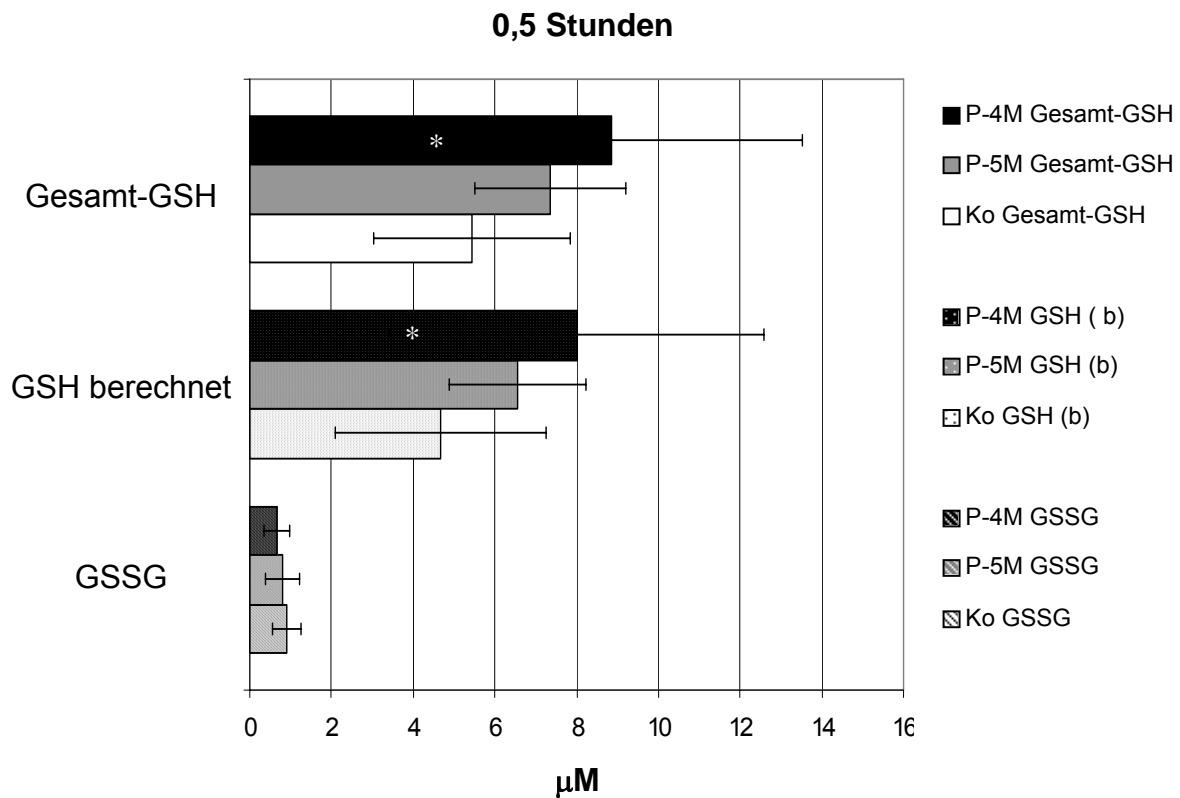


Abb.5:

Wirkung von Paraquat (P) auf das GSH-GSSG-System, dargestellt als $\text{MW} \pm \text{STABW}$: Bei einer Paraquatkonzentration von 10^{-4}M ($n=14$) kam es nach einer Inkubationszeit von 0,5 Stunden zu einer signifikanten Zunahme des Gesamt-GSH ($p<0,0366$) und des errechneten GSH [GSH(b)] ($p<0,0366$) bei nicht signifikant verändertem GSSG. Dagegen war bei einer Paraquatkonzentration von 10^{-5}M ($n=8$) keine signifikante Veränderung zur Kontrolle (nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur) darzustellen. Die Daten beziehen sich auf $100\mu\text{g}$ Protein.

Paraquat-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 1,5h Inkubationszeit

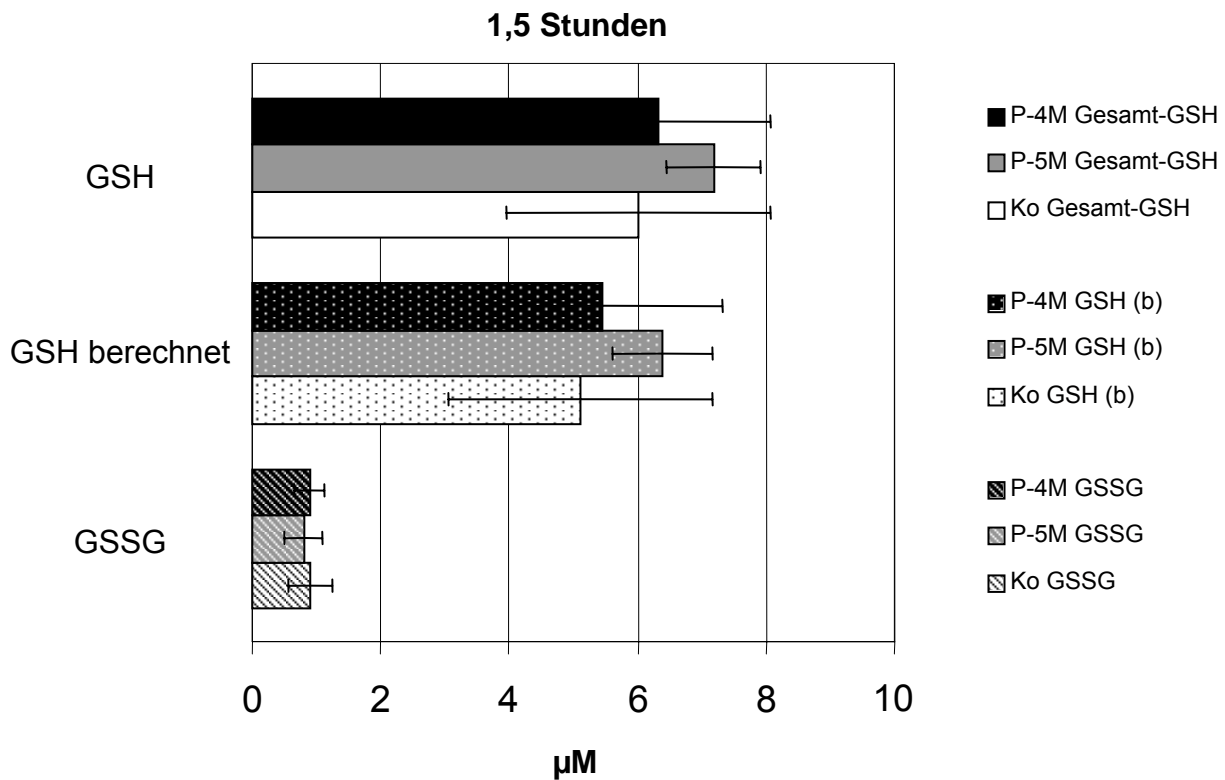


Abb.6:

Wirkung von Paraquat (P) auf das GSH-GSSG-System, dargestellt als MW \pm STABW: Bei einer Paraquatkonzentration von 10^{-4} M (n=12) und 10^{-5} M; (n=8) kam es nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden zu keiner signifikanten Zunahme des errechneten GSH [GSH(b)] sowie des GSSG. Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

Paraquat-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 3,5h Inkubationszeit

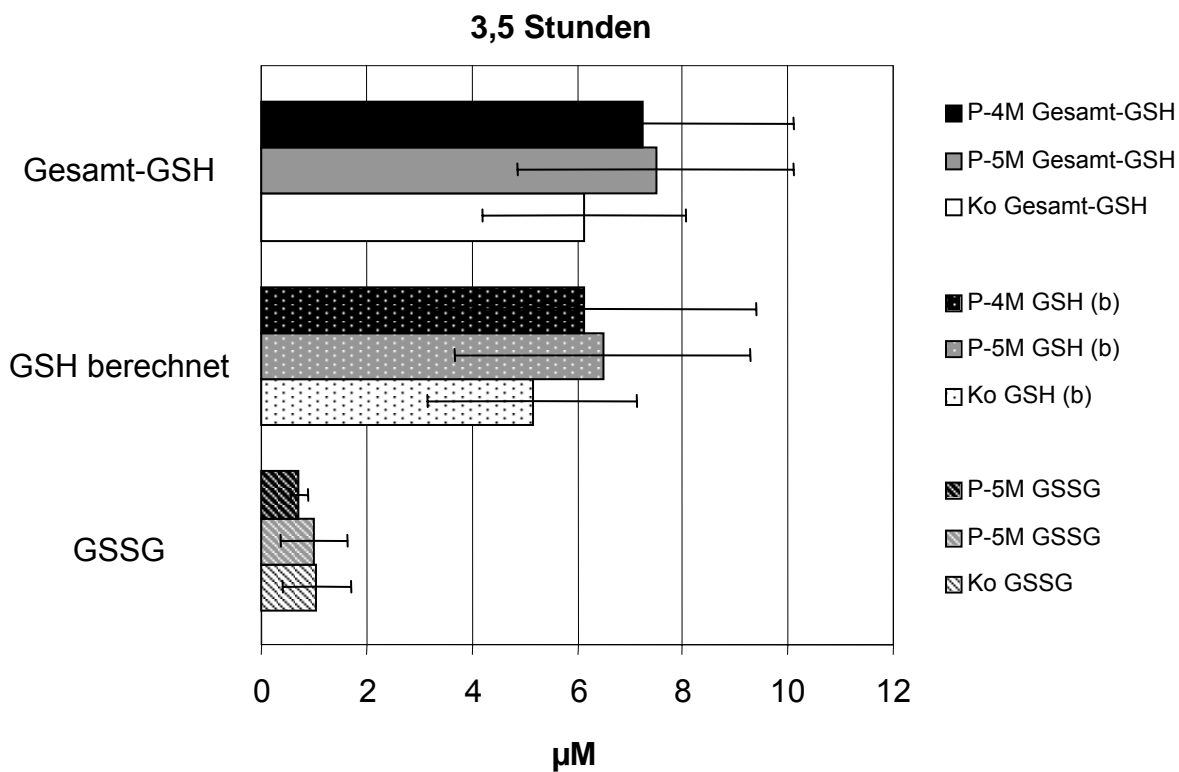


Abb.7:

Wirkung von Paraquat (P) auf das GSH-GSSG-System, dargestellt als $MW \pm STABW$: Bei einer Paraquatkonzentration von $10^{-4}M$ und $P10^{-5}M$ kam es nach einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden zu keiner signifikanten Zunahme des Gesamt GSH ($P10^{-4}M$; $n=14$ bzw. $P10^{-5}M$; $n=8$), des errechneten GSH [GSH(b)] ($P10^{-4}M$; $n=10$ bzw. $P10^{-5}M$; $n=8$), sowie des GSSG ($P10^{-4}M$; $n=13$ bzw. $P10^{-5}M$; $n=8$). Die Daten beziehen sich auf $100\mu g$ Protein.

6.3.1.2 Analyse des Mengenverhältnisses (quantitativ) von GSH und GSSG unter dem Einfluss von Paraquat

Das Verhältnis von GSH zu GSSG wurde durch die Formel:

Mengenverhältnis = GSH berechnet/GSSG definiert und für die Zeitpunkte mit signifikanten Veränderungen des GSH-GSSG-Systems ermittelt. Es betrug bei den Kontrollzellen 5:1.

Aus dem oben beschrieben signifikanten Anstieg des GSH bei konstantem GSSG ergab sich ein deutlicher Anstieg dieses Mengenverhältnisses zu Gunsten des GSH.

Nach Stimulation mit Paraquat in der Konzentration 10^{-4}M und 0,5h Inkubationszeit (n=14) zeigte sich eine Steigerung des Verhältnisses von 5:1 (Kontrolle) auf 12:1, bei Stimulation mit Paraquat in der Konzentration von 10^{-5}M bei 0,5h Inkubationszeit (n=8) wurde ein Anstieg auf 8:1 dokumentiert. Dies entspricht einer prozentualen Steigerung des Mengenverhältnisses um 133% bei Paraquat 10^{-4}M und um 64% bei Paraquat 10^{-5}M .

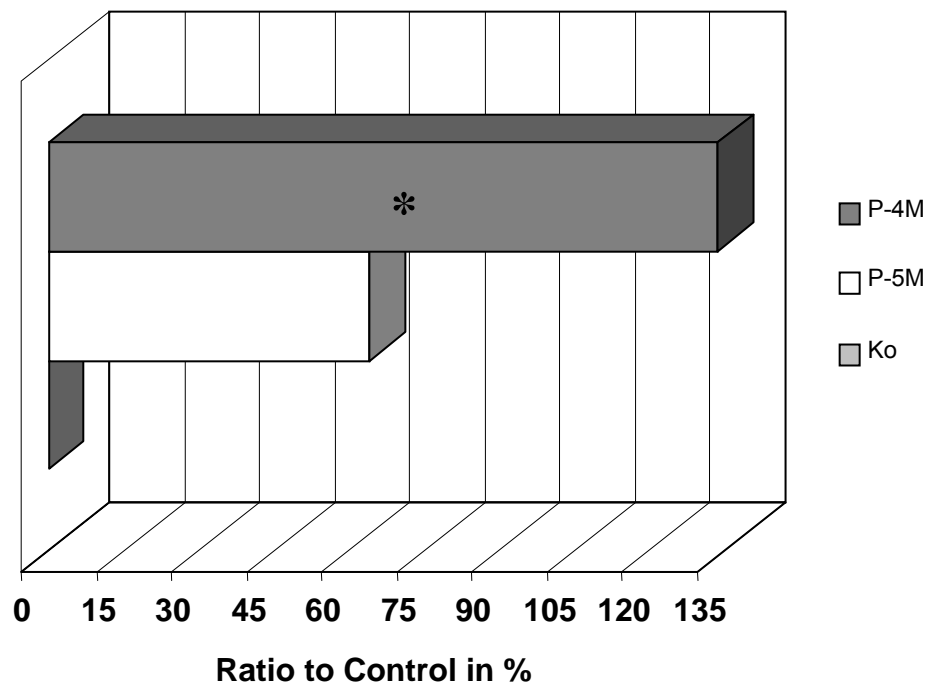
Paraquat-induziertes Mengenverhältnis von GSH zu GSSG

Abb.8:

Prozentualer Anstieg des Mengenverhältnisses von GSH zu GSSG, induziert durch einen signifikanten Anstieg ($p^* < 0,0366$) des Gesamt-GSH bei konstantem GSSG nach 0,5 Stunden Inkubationszeit und Stimulation mit Paraquat (P) 10^{-4} M (n=14).

6.3.2 Effekte von CRH auf das GSH-GSSG-System

6.3.2.1 Tabellarische / graphische Darstellung der Effekte

Analog zu der Paraquat-induzierten Reaktion wurde die Wirkung von CRH als möglicher Induktor einer Veränderung der GSH-GSSG-Homeostase untersucht.

Nach Inkubation (1,5h) mit CRH in den Konzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-6} M zeigte sich eine signifikante Reduktion des Gesamt-GSH und des errechneten GSH (*Gesamt-GSH – GSSG*) bei nicht signifikant verändertem GSSG. Eine Inkubation mit 0,5 und 3,5 Stunden zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen des GSH-GSSG-Systems unter dem Einfluss von CRH im Vergleich zu den Kontrollzellen (nicht stimuliert).

CRH-induzierte Stimulation des GSH-GSSG-Systems									
0,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko
MW	4,3604	4,6051	5,4367	3,5302	3,5347	4,6762	0,8303	0,707	0,9072
STABW	1,7683	1,3684	2,4058	1,6322	1,2348	2,5792	0,4238	0,2416	0,3571
p-Wert	0,1735	0,2021		0,1647	0,1537		0,5612	0,086	
n	12	17	27	12	12	28	12	12	27
1,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko
MW	3,8835	4,4821	6,0229	2,9894	3,5541	5,1142	0,8941	0,822	0,9088
STABW	1,6138	1,2547	2,0996	1,4405	1,2143	2,0602	0,3555	0,2743	0,3334
p-Wert	<i>0,0035*</i>	<i>0,0096*</i>		<i>0,0027*</i>	<i>0,0319*</i>		0,9026	0,4696	
n	12	18	26	12	10	26	12	10	26
3,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko	CRH ⁻⁵	CRH ⁻⁶	Ko
MW	4,8437	5,1448	6,1299	3,5748	3,8837	5,1486	0,8942	0,9079	1,0557
STABW	2,5928	1,636	1,915	2,7243	1,4016	1,9754	0,3918	0,3931	0,66
p-Wert	0,1022	0,0827		0,0583	0,0664		0,4433	0,4828	
n	12	18	26	12	12	23	12	12	23

Tab.2:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der CRH-induzierten Modulation des GSH-GSSG-Systems. Es sind jeweils Mittelwert (MW), Standardabweichung (STABW), Signifikanz (p) und Anzahl der Versuche (n) angegeben. Signifikante Werte wurden durch Kursivschrift und (*) gekennzeichnet.

CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 1,5h Inkubationszeit

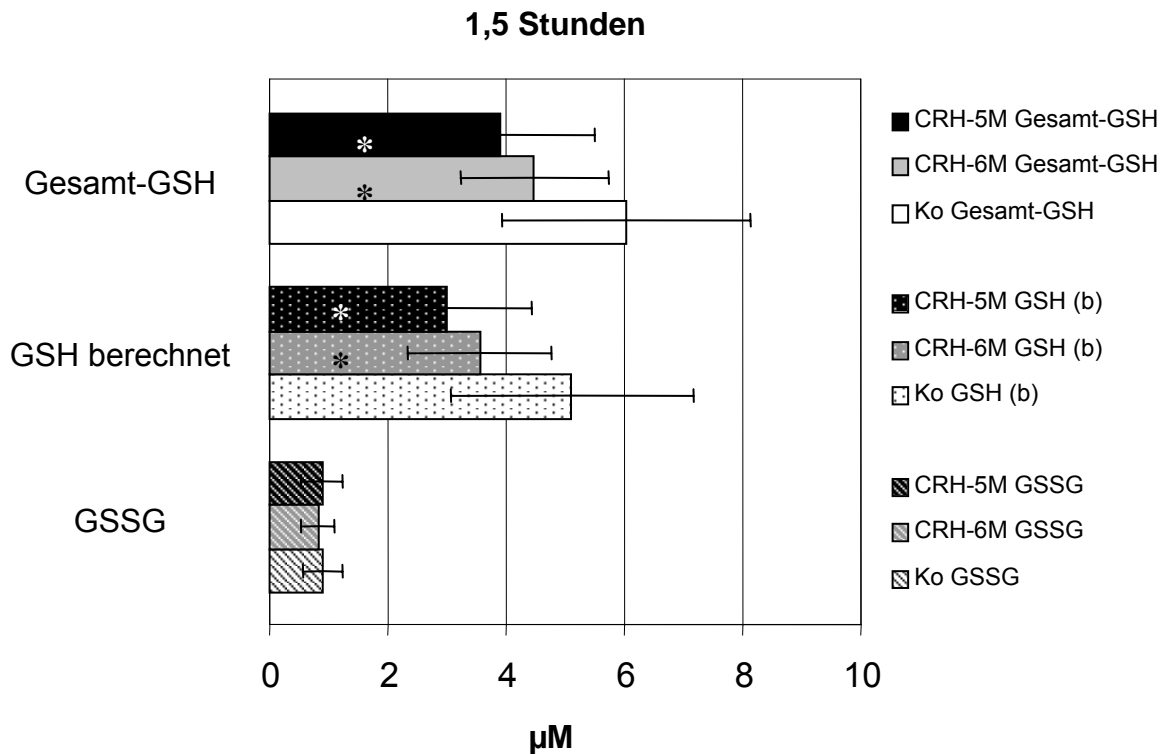


Abb.9:

Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-System: Dargestellt ist die signifikante Reduktion des Gesamt-GSH und des errechneten GSH [GSH(b)]. Sowohl bei einer CRH-Konzentration von 10^{-5}M als auch bei der Konzentration 10^{-6}M (Inkubation 1,5 Stunden) ist eine signifikante Reduktion des Gesamt-GSH (CRH- 5M , $n=12$; $p^*<0,0383$ bzw. CRH 10^{-6}M , $n=18$; $p^*<0,0335$) und des errechneten GSH [GSH (b)] (CRH- 5M , $n=12$; $p^*<0,0383$ bzw. CRH 10^{-6}M , $n=10$; $p^*<0,0401$) bei nicht signifikant verändertem GSSG (CRH- 5M , $n=12$ bzw. CRH 10^{-6}M , $n=10$) nachweisbar. Die Daten beziehen sich auf $100\mu\text{g}$ Protein.

CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 0,5h Inkubationszeit

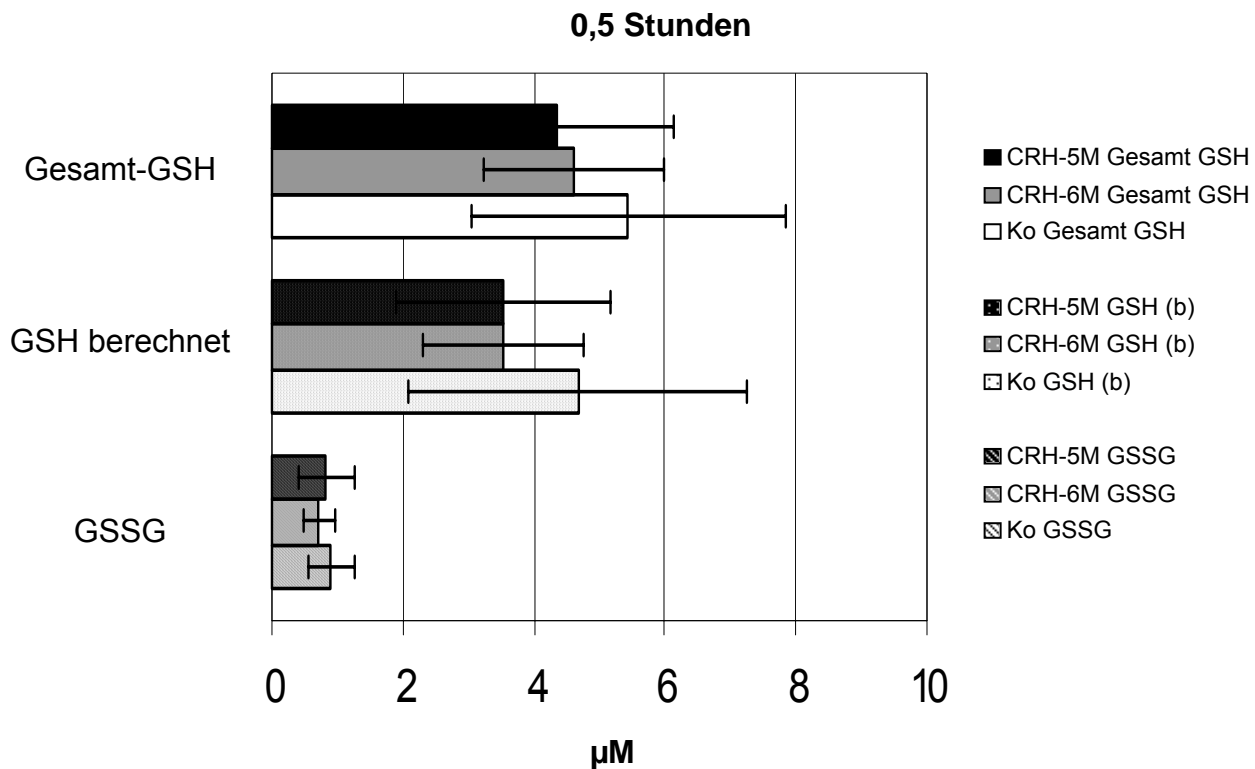


Abb.10:

Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-System: Nach Inkubation mit CRH (0,5 Stunden) zeigte sich keine signifikante Reduktion des Gesamt-GSH (CRH⁻⁵M, n=12 bzw. CRH 10⁻⁶M, n=17), des errechneten GSH [GSH[(b)] (CRH⁻⁵M, n=12 bzw. CRH 10⁻⁶M, n=12) sowie des GSSG (CRH⁻⁵M, n=12 bzw. CRH 10⁻⁶, n=12). Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 3,5h Inkubationszeit

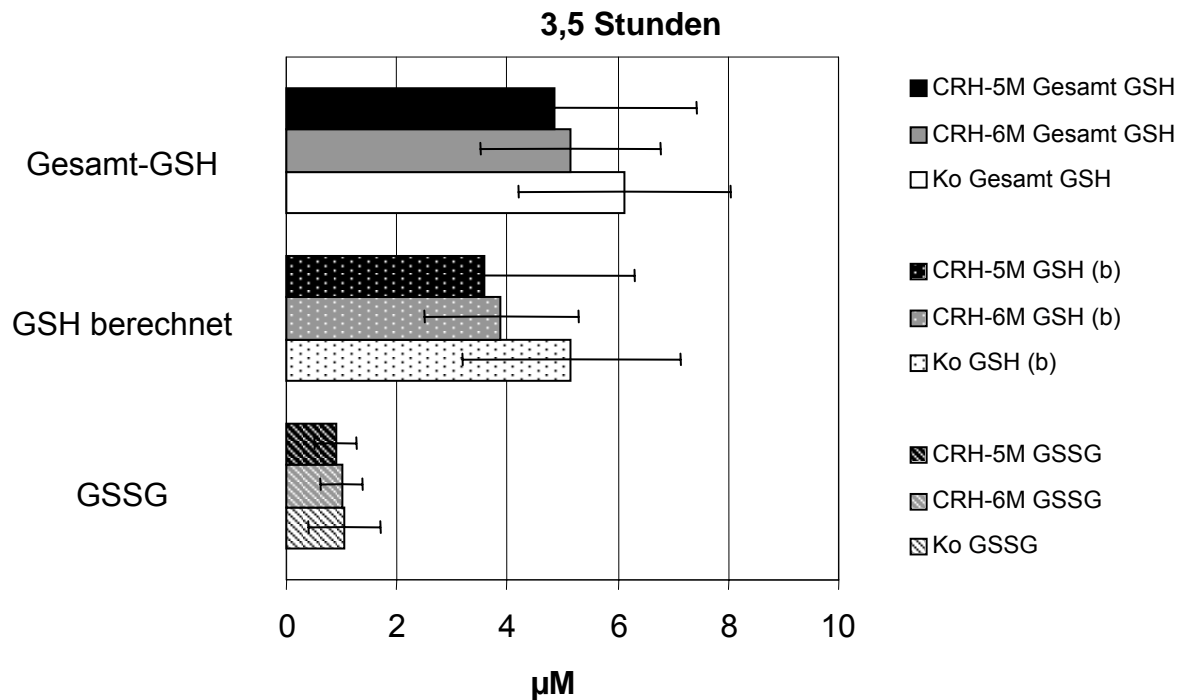


Abb.11:

Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-System: Nach Inkubation mit CRH (0,5 Stunden) zeigte sich keine signifikante Reduktion des Gesamt-GSH (CRH 10^{-5} M, n=12 bzw. CRH 10^{-6} M, n=18), des errechneten GSH [GSH[(b)] (CRH 10^{-5} M, n=12 bzw. CRH 10^{-6} M, n=12) sowie des GSSG (CRH 10^{-5} M, n=12 bzw. CRH 10^{-6} M, n=12). Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

6.3.2.2. Analyse des Mengenverhältnisses (quantitativ) von GSH und GSSG unter dem Einfluss von CRH

Das Verhältnis von GSH zu GSSG wurde durch die Formel:

Mengenverhältnis = *GSH berechnet*/GSSG definiert und für die Zeitpunkte mit signifikanten Veränderungen des GSH-GSSG-Systems ermittelt. Es betrug bei den Kontrollzellen 5:1.

Die bei der Analyse der Einzelkomponenten festgestellte Verminderung der GSH-Konzentration bei gleichbleibenden GSSG-Werten führte hier zu einer Reduktion des Mengenverhältnisses um 40,5% bei einer CRH-Konzentration von 10^{-5} M und um 23% bei der CRH-Konzentration von 10^{-6} M.

CRH-induziertes Mengenverhältnis von GSH zu GSSG

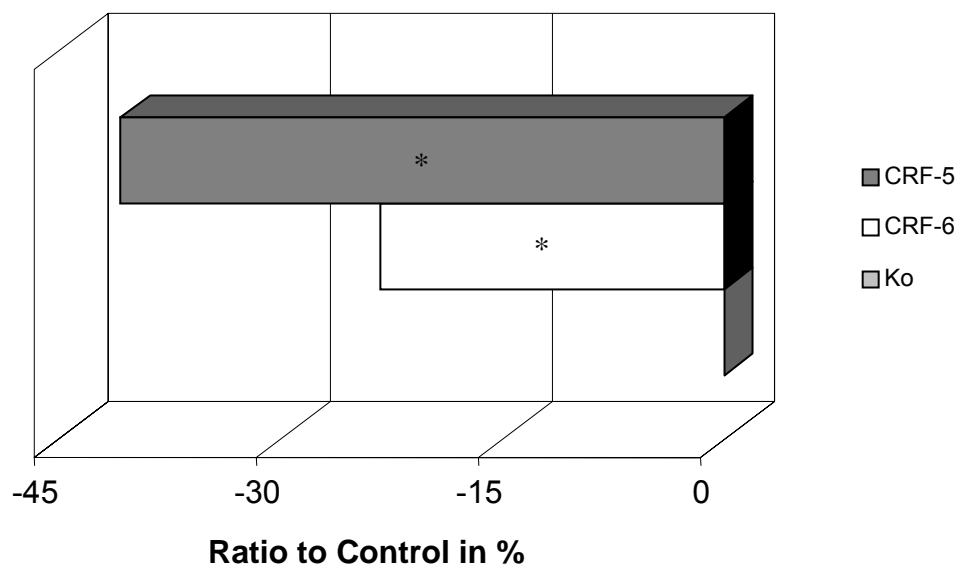


Abb.12:

Prozentualer Abfall des Mengenverhältnisses von GSH zu GSSG, induziert durch eine signifikante Reduktion des Gesamt-GSH (CRH 10^{-5} M, n=12, $p^*<0,0383$; CRH 10^{-6} M, n=18, $p^*<0,0355$) und des errechneten GSH bei konstantem GSSG nach Stimulation mit CRH (10^{-5} M und 10^{-6} M), Inkubationszeit 1,5h.

6.3.3. Wirkung von Astressin auf das GSH-GSSG-System und auf dessen durch CRH-induzierte Effekte

6.3.3.1 Effekte von Astressin auf das unstimulierte GSH-GSSG-System

Durch die alleinige Inkubation von Astressin mit den HMEC-1 sollten mögliche pharmakologische Effekte des CRH-Rezeptor-Antagonisten Astressin auf das zu untersuchende System ausgeschlossen werden. Dazu wurden die beiden Astressinkonzentrationen [10^{-6} M sowie 10^{-7} M] bei Inkubationszeiten von 0,5h, 1,5h und 3,5h untersucht.

Es konnten zu keinem Abnahmezeitpunkt und bei keiner der beiden eingesetzten Astressinkonzentrationen signifikante Veränderungen im GSH-GSSG-System gemessen werden. Bei somit fehlender eigener intrinsischer Aktivität konnte somit Astressin zur Blockade der CRH-Rezeptoren benutzt werden.

Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System									
0,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko
MW	4,256	4,6278	5,4367	2,9992	3,4188	4,6762	0,8453	1,1438	0,9072
STABW	1,4067	1,012	2,4058	1,6086	0,8473	2,5792	0,3353	0,1188	0,3571
p	0,1978	0,3646		0,1993	0,1872		0,6656	0,0967	
n	8	8	27	8	8	28	8	8	27
1,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko
MW	5,7957	5,8613	6,0229	4,9233	4,505	5,1142	0,8725	1,1869	0,9088
STABW	3,7178	1,9366	2,0996	3,7306	1,508	2,0602	0,1286	0,3885	0,3334
p	0,8265	0,8477		0,8527	0,446		0,7672	0,0836	
n	8	8	26	8	8	26	8	8	26
3,5h	Gesamt-GSH			GSH berechnet			GSSG		
	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko	A⁻⁶M	A⁻⁷M	Ko
MW	9,103	7,3847	6,1299	7,5002	5,2534	5,1486	1,6029	1,5933	1,0557
STABW	7,7643	3,3372	1,915	7,2664	2,9731	1,9754	0,6537	0,4289	0,66
p	0,0758	0,1871		0,159	0,9139		0,0522	0,0709	
n	8	8	26	8	7	23	8	7	23

Tab.3:

Die Tabelle zeigt, dass Astressin (A) zu keinem Zeitpunkt (0,5h, 1,5h, 3,5h) eine intrinsische Aktivität gegenüber dem GSH-GSSG-System besitzt. Für die beiden verwendeten Astressinkonzentrationen [10^{-6} M, 10^{-7} M] wurden jeweils der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (STABW), die Signifikane (p), sowie die Anzahl der durchgeführten Versuch (n). angegeben

Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 0,5h Inkubationszeit

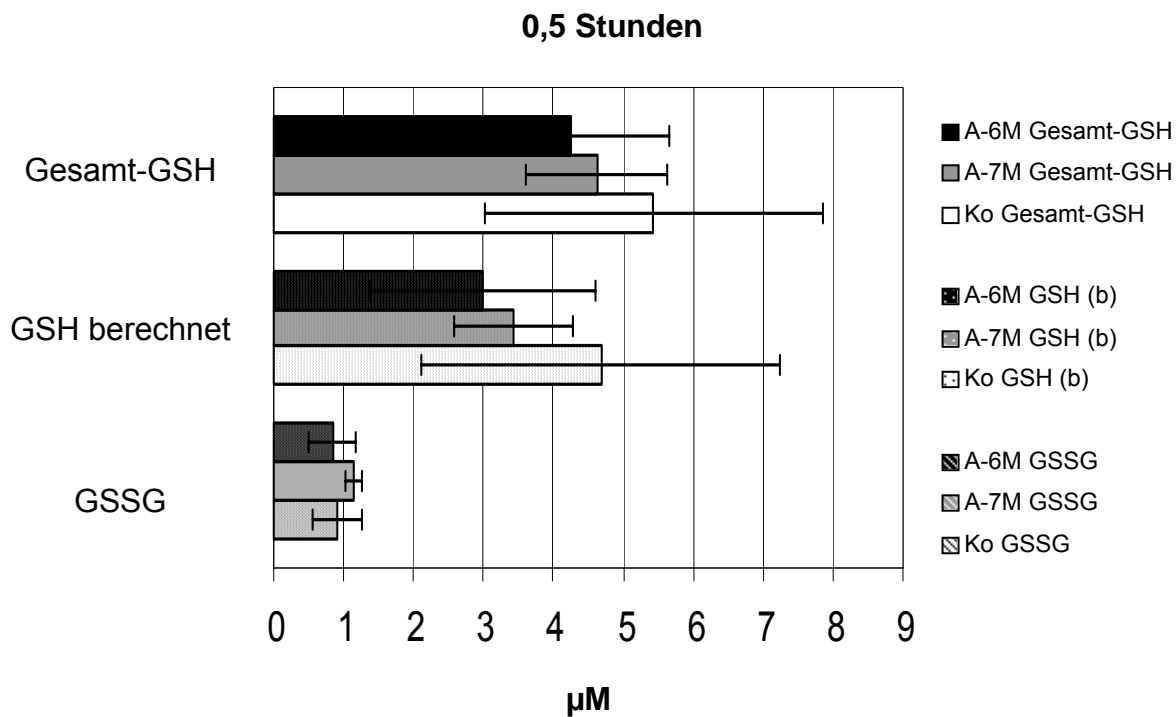


Abb.13:

Wirkung von Astressin (A) auf das GSH-GSSG-System: Nach einer Inkubationszeit von 0,5 Stunden zeigte sich keine signifikante intrinsische Aktivität des Astressins ($A^{-6}M$, $n=8$; $A^{-7}M$, $n=8$) auf das Gesamt-GSH das errechnete GSH [GSH(b)] sowie das GSSG. Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 1,5h Inkubationszeit

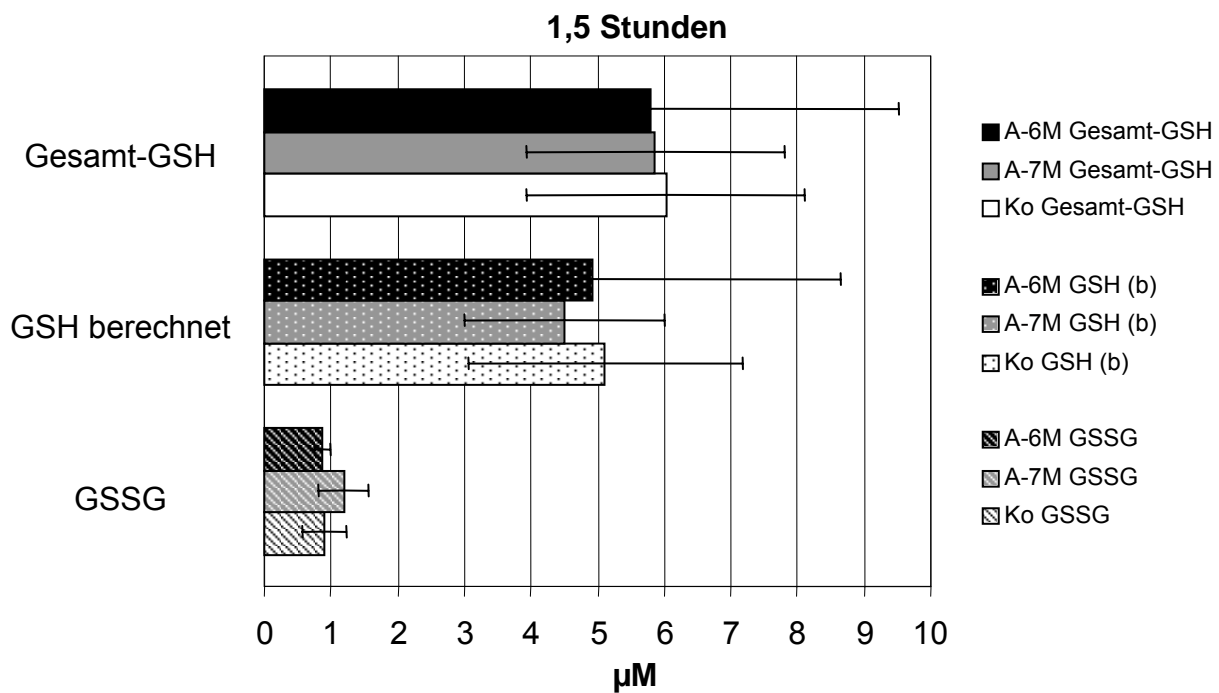


Abb.14:

Wirkung von Astressin ($A^{-6}M$, $n=8$; $A^{-7}M$, $n=8$) auf das GSH-GSSG-System: Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden zeigte sich keine signifikante intrinsische Aktivität des Astressins auf das Gesamt-GSH das errechnete GSH [GSH(b)] sowie das GSSG. Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

Astressin-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-System nach 3,5h Inkubationszeit

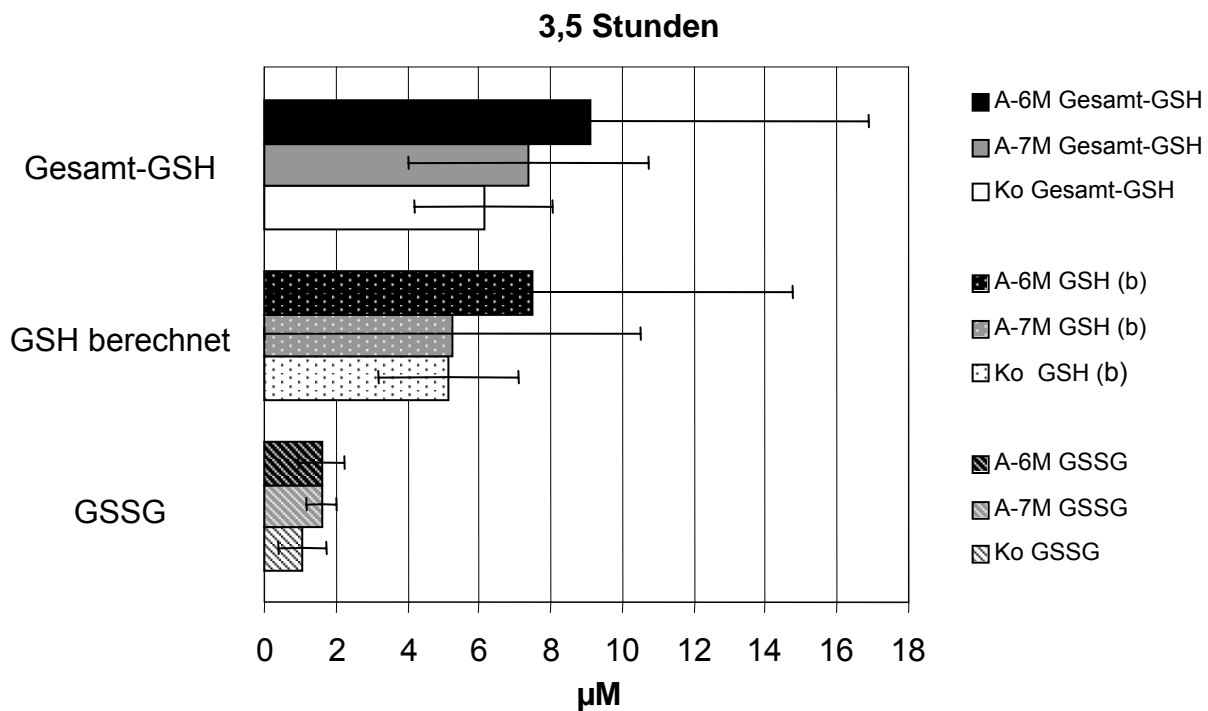


Abb.15:

Wirkung von Astressin (A) auf das GSH-GSSG-System: Nach einer Inkubationszeit von 0,5 Stunden zeigte sich keine signifikante intrinsische Aktivität des Astressins auf das Gesamt-GSH ($A^{-6}M$, $n=8$; $A^{-7}M$, $n=8$), das errechnete GSH [GSH(b)] ($A^{-6}M$, $n=8$; $A^{-7}M$, $n=7$) sowie das GSSG ($A^{-6}M$, $n=8$; $A^{-7}M$, $n=7$). Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

6.3.3.2 Effekte von Astressin auf das mit CRH stimulierte GSH-GSSG-System: Antagonisierung

6.3.3.2.1 Tabellarisch / graphische Darstellung der Effekte

Für die Antagonisierungsversuche wurde die CRH-Konzentration von 10^{-6}M zur Stimulation des GSH-GSSG-Systems eingesetzt, Inkubationszeit 1,5h. Die CRH-induzierte Stimulation konnte durch den Einsatz des CRH-Rezeptor-Antagonisten Astressin signifikant reduziert werden. Im Umkehrschluss konnte somit gezeigt werden, dass die Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-System tatsächlich über CRH-Rezeptoren vermittelt wird.

Antagonisierung der CRH-induzierten Effekte auf das GSH-GSSG-Systems durch Astressin				
	Gesamt-GSH			
	CRH ^{-6}M	CRH ^{-6}M +A ^{-6}M	CRH ^{-6}M +A ^{-7}M	Ko
MW	4,4821	4,7462	5,1674	6,0229
STABW	1,2547	2,3197	1,0598	2,0996
p-Wert	<i>0,0096*</i>	0,1973	0,344	
n	18	6	6	26
GSH berechnet				
	CRH ^{-6}M	CRH ^{-6}M +A ^{-6}M	CRH ^{-6}M +A ^{-7}M	Ko
MW	3,5541	4,0724	4,3027	5,1142
STABW	1,2143	2,0725	1,1407	2,0602
p-Wert	<i>0,0319*</i>	0,2736	0,3625	
n	10	6	6	26
GSSG				
	CRH ^{-6}M	CRH ^{-6}M +A ^{-6}M	CRH ^{-6}M +A ^{-7}M	Ko
MW	0,822	0,6738	0,8646	0,9088
STABW	0,2743	0,2764	0,1369	0,3334
p-Wert	0,4696	0,1203	0,7549	
n	10	6	6	26

Tab.4:

Der Effekt von Astressin [10^{-6}M , 10^{-7}M] auf die CRH-induzierte Reduktion des Gesamt-GSH und des errechneten GSH. Es wurden jeweils der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (STABW), die Signifikanz (p) und die Anzahl der Versuche (n) angegeben. Die signifikanten Werte sind durch Kursivschrift und (*) hervorgehoben.

Inhibierung der CRH-induzierte Effekte auf das GSH-GSSG-Systems nach 1,5h Inkubationszeit durch Astressin

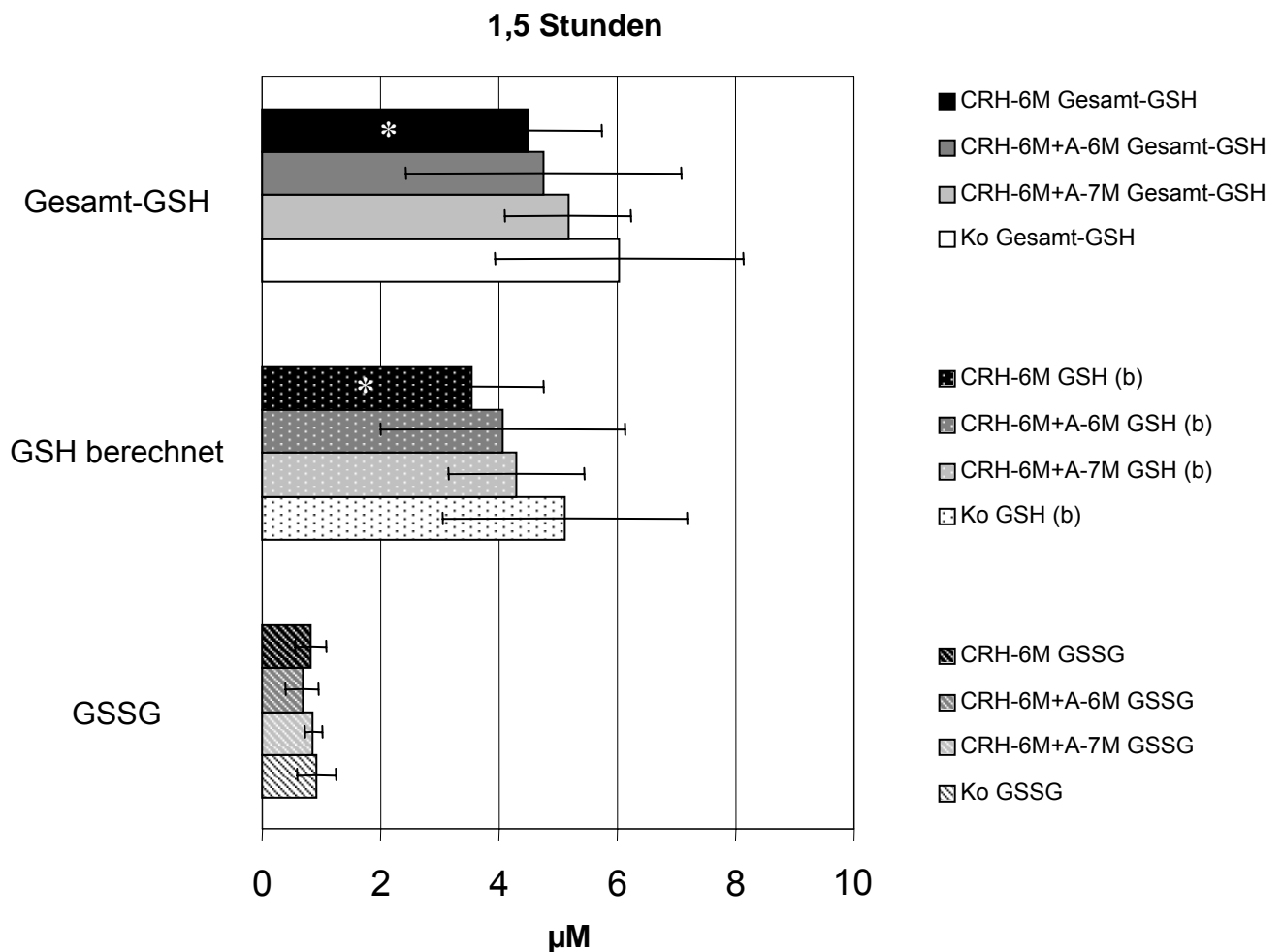


Abb.16:

Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden zeigte sich eine signifikante Antagonisierung (CRH 10^{-6} M blockiert mit A 10^{-6} M, n=6; CRH 10^{-6} M blockiert mit A 10^{-7} M, n=6) der CRH-induzierten Effekte (Gesamt-GSH n=18, $p^* < 0,0335$; GSH berechnet [GSH (b)] n=10, $p^* < 0,0401$) auf das GSH-GSSG-System. Dargestellt mit $MW \pm STABW$. Die Daten beziehen sich auf 100µg Protein.

6.3.3.2.2 Analyse des Mengenverhältnisses (quantitativ) von GSH und GSSG unter dem Einfluss von CRH und Astressin

Das Verhältnis von GSH zu GSSG wurde durch die Formel:

Mengenverhältnis = GSH berechnet/GSSG definiert und für die Zeitpunkte mit signifikanten Veränderungen des GSH-GSSG-Systems ermittelt. Es betrug bei den Kontrollzellen 5:1.

Die Effekte des CRH auf das Mengenverhältnis von GSH zu GSSG konnten durch Astressin konzentrationsabhängig inhibiert werden. So ergab die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit CRH in einer Konzentration von 10^{-6}M und Astressin in gleicher Konzentration einen nicht signifikanten Anstieg des Mengenverhältnisses um 7% im Vergleich zum Kontrollkollektiv, während die Inkubation mit CRH ohne Antagonisierung einen Abfall des Mengenverhältnisses um 23% zeigte. Somit wurde das Mengenverhältnis durch die Zugabe von 10^{-6}M Astressin um 30% verschoben.

Die Inkubation von CRH (10^{-6}M) mit Astressin (10^{-7}M) ergab hingegen nur eine Veränderung des Mengenverhältnisses zur nicht antagonistierter CRH-Wirkung von 12%. Im Vergleich zur Kontrolle entspricht dies einer Reduktion des Mengenverhältnisses und damit einer Verschiebung des Systems zu Gunsten des GSSG um 11%.

Astressin-induzierte Antagonisierung der CRH-Wirkung auf das Mengenverhältnis von GSH zu GSSG

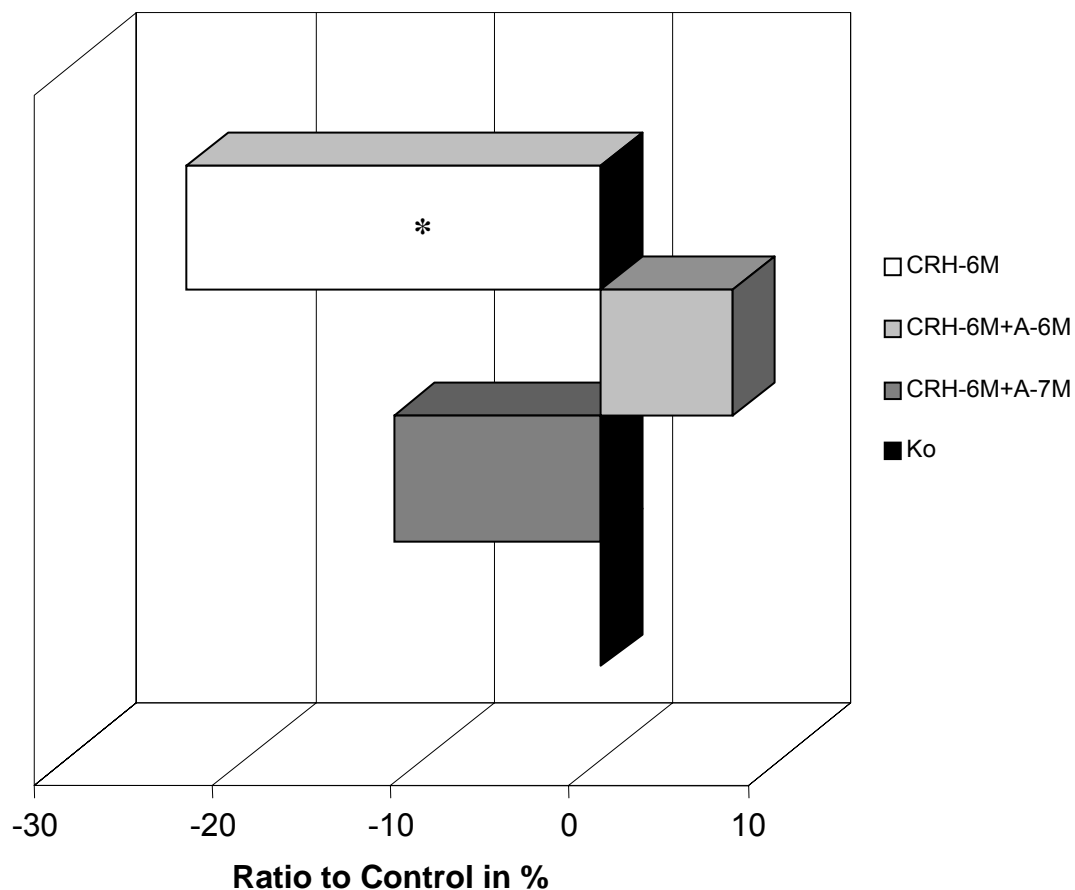


Abb.17:

Modifikation der CRH-induzierten Effekte (Gesamt-GSH $n=18$, $p^*<0,0335$; GSH berechnet [GSH (b)] $n=10$, $p^*<0,0401$) auf das GSH-GSSG-Mengenverhältnis unter Einfluss von Astressin (A) (CRH $10^{-6}M$ blockiert mit A $10^{-6}M$, $n=6$; CRH $10^{-6}M$ blockiert mit A $10^{-7}M$, $n=6$) nach einer Inkubationszeit von 1,5h. Die durch den CRH-induzierten signifikanten Abfall des GSH entstandene Veränderung des Mengenverhältnisses ($p^*<0,0335$) konnte durch den Einsatz von Astressin aufgehoben werden.

6.3.4 Darstellung der Versuchsergebnisse im Zeitverlauf

6.3.4.1 Gesamt-GSH im Zeitverlauf

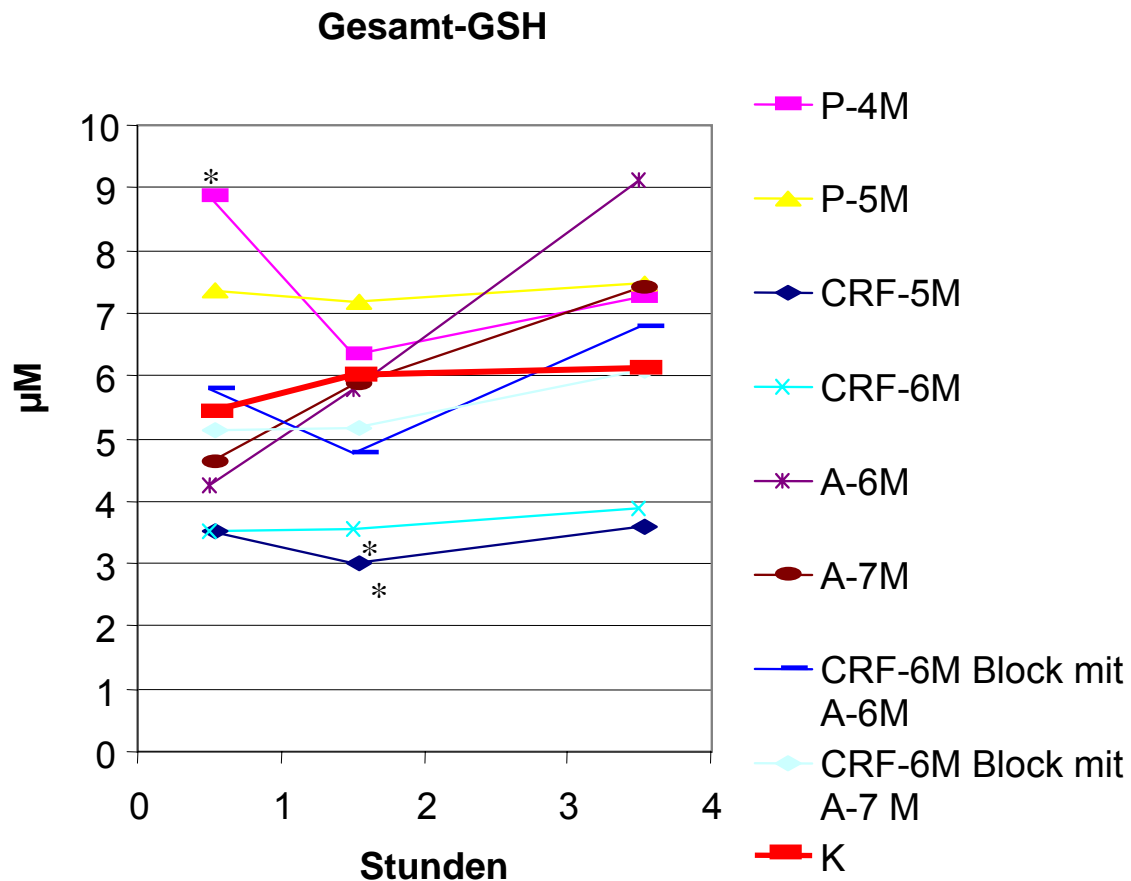


Abbildung 18:

Diese Abbildung zeigt einen Überblick der Ergebnisse der Gesamt-GSH-Versuchsreihen im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Testreihen. Die zur Kontrollgruppe (unstimulierte HMEC-1-Zellen) signifikant veränderten Werte sind mit * gekennzeichnet. Die Kontrollgruppe (K) wurde besonders hervorgehoben. Die n-Werte der einzelnen Substanzen und deren Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten können der Tabelle 5 entnommen werden.

6.3.4.2 GSH berechnet [GSH(b)] im Zeitverlauf

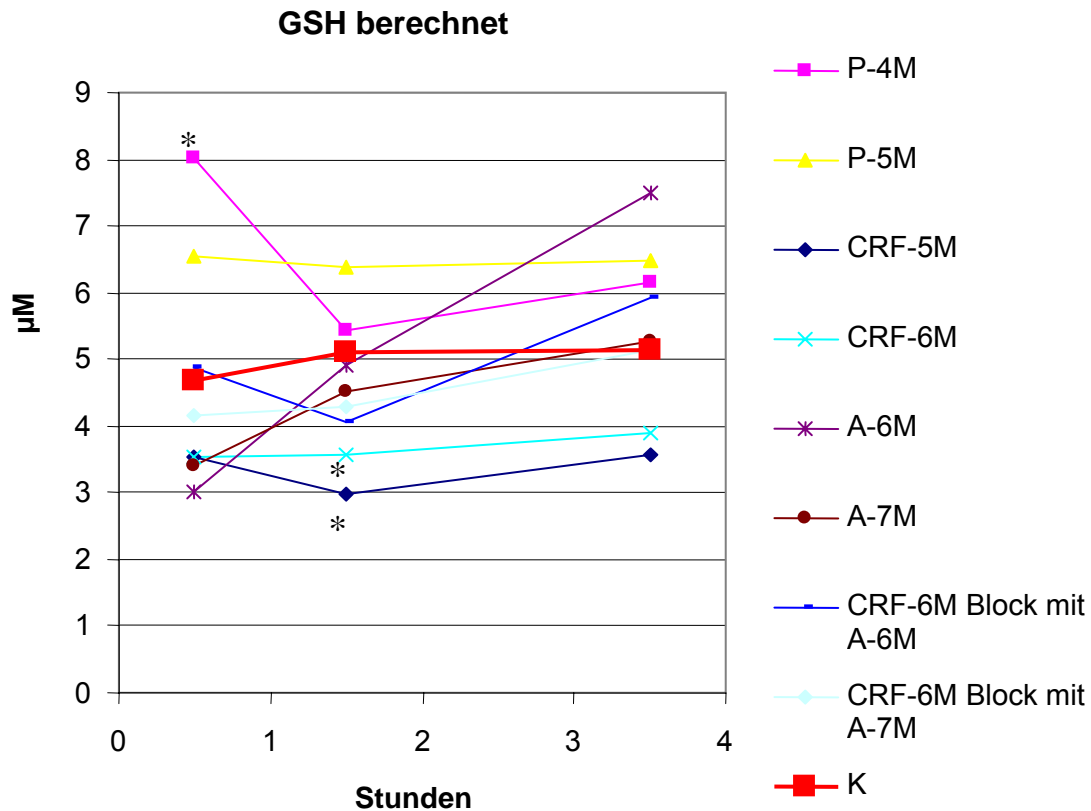


Abbildung 19:

Diese Abbildung zeigt einen Überblick der Ergebnisse des errechneten GSH im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Testreihen. Die zur Kontrollgruppe (unstimulierte HMEC-1-Zellen) signifikant veränderten Werte sind mit * gekennzeichnet. Die Kontrollgruppe (K) wurde besonders hervorgehoben. Die n-Werte der einzelnen Substanzen und deren Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten können der Tabelle 6 entnommen werden.

6.3.4.4 GSSG im Zeitverlauf

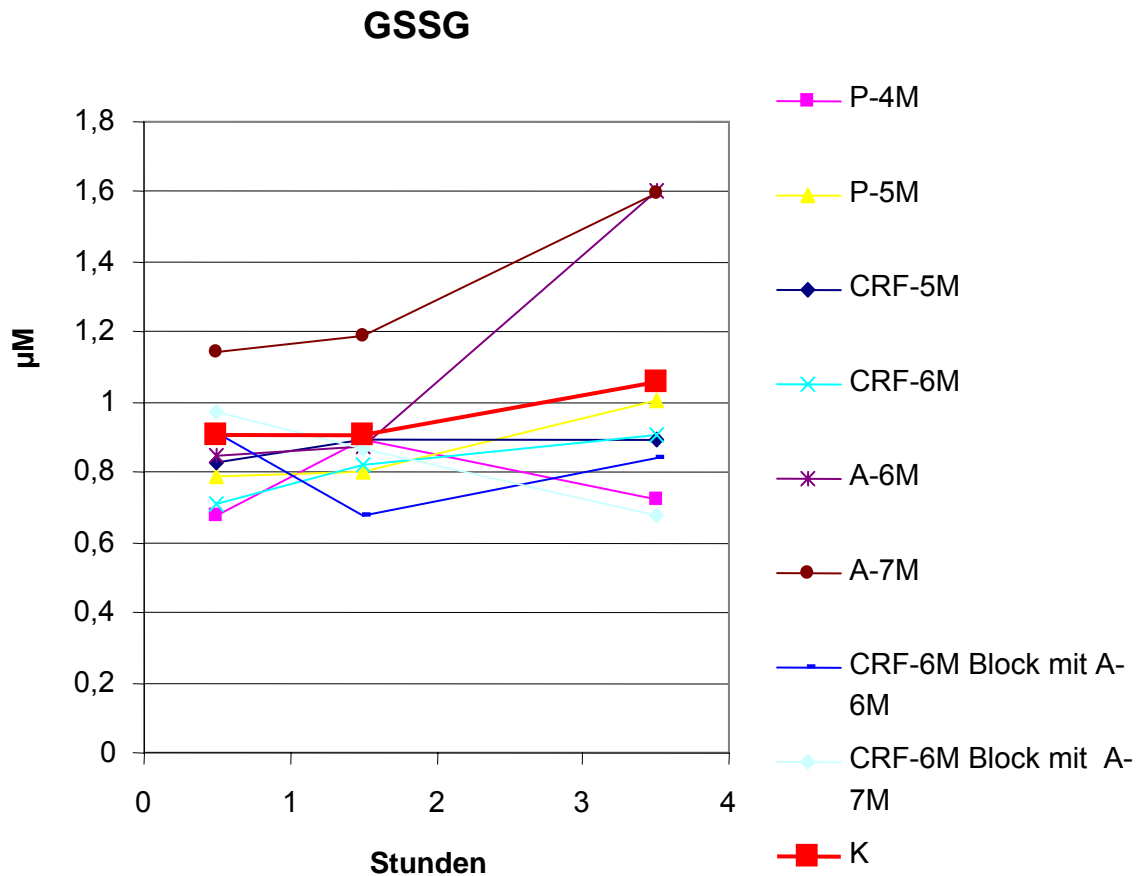


Abbildung 20:

Diese Abbildung zeigt einen Überblick der Ergebnisse der Gesamt-GSH-Versuchsreihen im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Testreihen. Die Kontrollgruppe (K) wurde besonders hervorgehoben. Die n-Werte der einzelnen Substanzen und deren Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten können der Tabelle 7 entnommen werden.

6.4 Übersicht über die durchgeführten statistischen Tests und deren Ergebnisse für Gesamt-GSH, GSH berechnet und GSSG

6.4.1 Überblick über die statistische Auswertung von Gesamt-GSH

Zeit (h)	Getestete Gruppen	Versuchsanzahl (n)	Kolmogorow-Smirnov D / D kritisch	Kolmogorow-Smirnov P	Mittelwert	Standardabweichung	t test (p-Wert)	Erforderliches Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur
0,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	14	0,13 / 0,35 0,10 / 0,26	0,98 0,96	8,86 5,44	4,65 2,41	0,0033*	0,0366
0,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,20 / 0,46 0,10 / 0,26	0,89 0,96	7,35 5,44	1,85 2,41	0,0470	0,0421
0,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,15 / 0,38 0,10 / 0,26	0,99 0,96	4,36 5,44	1,77 2,41	0,1735	0,0383
0,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	17	0,14 / 0,32 0,10 / 0,26	0,98 0,96	4,61 5,44	1,37 2,41	0,2021	0,0342
0,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,16 / 0,46 0,10 / 0,26	0,99 0,96	4,26 5,44	1,41 2,41	0,1978	0,0421
0,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,24 / 0,46 0,10 / 0,26	0,76 0,96	4,63 5,44	1,01 2,41	0,3646	0,0421
0,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,22 / 0,52 0,10 / 0,26	0,94 0,96	5,79 5,44	1,38 2,41	0,7337	0,0442
0,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	5	0,27 / 0,57 0,10 / 0,26	0,87 0,96	5,13 5,44	1,31 2,41	0,7853	0,0452
1,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	12	0,17 / 0,38 0,12 / 0,27	0,87 0,86	6,33 6,02	1,74 2,10	0,6575	0,0383
1,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,17 / 0,46 0,12 / 0,27	0,98 0,86	7,19 6,02	0,73 2,10	0,1374	0,0421
1,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,15 / 0,38 0,12 / 0,27	0,93 0,86	3,88 6,02	1,61 2,10	0,0035*	0,0383
1,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	18	0,14 / 0,31 0,12 / 0,27	0,85 0,86	4,48 6,02	1,25 2,10	0,0096*	0,0335
1,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,35 / 0,46 0,12 / 0,27	0,26 0,86	5,80 6,02	3,72 2,10	0,8265	0,0421
1,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,32 / 0,46 0,12 / 0,27	0,40 0,86	5,86 6,02	1,94 2,10	0,8477	0,0421
1,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,39 / 0,52 0,12 / 0,27	0,31 0,86	4,75 6,02	2,31 2,10	0,1973	0,0442

1,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	6	0,22 / 0,52 0,12 / 0,27	0,93 0,86	5,17 6,02	1,06 2,10	0,3440	0,0442
3,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	14	0,12 / 0,35 0,13 / 0,27	0,99 0,80	7,26 6,13	2,83 1,92	0,1413	0,0366
3,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,17 / 0,46 0,13 / 0,27	0,97 0,80	7,48 6,13	2,61 1,92	0,1173	0,0442
3,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,15 / 0,38 0,13 / 0,27	0,94 0,80	4,84 6,13	2,59 1,92	0,1022	0,0383
3,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	18	0,21 / 0,31 0,13 / 0,27	0,38 0,80	5,14 6,13	1,64 1,92	0,0827	0,0335
3,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,20 / 0,46 0,13 / 0,27	0,91 0,80	9,10 6,13	7,76 1,92	0,0758	0,0421
3,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,23 / 0,46 0,13 / 0,27	0,80 0,80	7,38 6,13	3,33 1,92	0,1871	0,0421
3,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,25 / 0,52 0,13 / 0,27	0,84 0,80	6,77 6,13	0,57 1,92	0,4303	0,0442
3,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	6	0,26 / 0,52 0,13 / 0,27	0,83 0,80	6,06 6,13	1,02 1,92	0,9364	0,0442

Tab 5:

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Fallzahl der durchgeführten Experimente zur Bestimmung des Gesamt-GSH, die angewandten statistischen Tests und die Ergebnisse der Tests in Kurzfassung. Signifikante Werte sind in fettem Kursivdruck geschrieben und mit * markiert.

6.4.2 Überblick über die statistische Auswertung von errechnetem GSH [GSH(b)]

Zeit (h)	Getestete Gruppen	Versuchszahl (n)	Kolmogorow-Smirnov D / D kritisch	Kolmogorow-Smirnov P	Mittelwert	Standardabweichung	t test (p-Wert)	Erforderliches Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur
0,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	14	0,14 / 0,35 0,11 / 0,26	0,93 0,89	8,00 4,68	4,58 2,57	0,0043*	0,0366
0,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,19 / 0,46 0,11 / 0,26	0,94 0,89	6,55 4,68	1,68 2,57	0,0423	0,0421
0,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,17 / 0,38 0,11 / 0,26	0,86 0,89	3,53 4,68	1,63 2,57	0,1781	0,0383
0,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	12	0,11 / 0,38 0,11 / 0,26	0,998 0,89	3,53 4,68	1,23 2,57	0,1658	0,0383
0,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,15 / 0,46 0,11 / 0,26	0,99 0,89	2,999 4,68	1,61 2,57	0,2092	0,0421
0,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,23 / 0,46 0,11 / 0,26	0,76 0,89	3,42 4,68	0,85 2,57	0,1957	0,0421
0,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,26 / 0,52 0,11 / 0,26	0,83 0,89	4,88 4,68	1,40 2,57	0,8557	0,0442
0,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	5	0,22 / 0,57 0,11 / 0,26	0,96 0,86	4,16 4,68	1,27 2,57	0,6680	0,0452
1,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	12	0,15 / 0,38 0,13 / 0,26	0,94 0,80	5,44 5,11	1,87 2,06	0,6449	0,0383
1,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,21 / 0,46 0,13 / 0,26	0,87 0,80	6,38 5,11	0,77 2,06	0,1006	0,0421
1,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,16 / 0,38 0,13 / 0,26	0,93 0,80	2,99 5,11	1,44 2,06	0,0027*	0,0383
1,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	10	0,21 / 0,41 0,13 / 0,80	0,76 0,80	3,55 5,11	1,21 2,06	0,0319*	0,0401
1,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,37 / 0,46 0,13 / 0,26	0,23 0,80	4,92 5,11	3,73 2,06	0,8527	0,0421
1,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,28 / 0,46 0,13 / 0,26	0,54 0,80	4,51 5,11	1,51 2,06	0,4460	0,0421
1,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,39 / 0,52 0,13 / 0,26	0,33 0,80	4,07 5,11	2,07 2,06	0,2736	0,0442
1,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	6	0,18 / 0,52 0,13 / 0,26	0,99 0,80	4,30 5,11	1,14 2,06	0,3625	0,0442
3,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	10	0,22 / 0,41 0,15 / 0,28	0,70 0,72	6,14 5,14	3,26 1,98	0,2862	0,0401
3,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,18 / 0,46 0,15 / 0,28	0,97 0,72	6,48 5,14	2,81 1,98	0,1514	0,0421
3,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,18 / 0,38 0,15 / 0,28	0,85 0,72	3,57 5,14	2,72 1,98	0,0583	0,0383

3,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	12	0,20 / 0,38 0,15 / 0,28	0,74 0,72	3,88 5,14	1,40 1,98	0,0664	0,0383
3,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,22 / 0,46 0,15 / 0,28	0,83 0,72	7,50 5,14	7,27 1,98	0,1590	0,0421
3,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	7	0,24 / 0,49 0,15 / 0,28	0,81 0,72	5,25 5,14	2,97 1,98	0,9139	0,0431
3,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,24 / 0,52 0,15 / 0,28	0,88 0,72	5,93 5,14	0,54 1,98	0,3524	0,0442
3,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	6	0,23 / 0,52 0,15 / 0,28	0,91 0,72	5,15 5,14	1,20 1,98	0,7819	0,0442

Tab 6:

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Fallzahl der durchgeführten Experimente zur Bestimmung des errechneten GSH, die angewandten statistischen Tests und die Ergebnisse dieser Tests in Kurzfassung. Signifikante Werte sind in fettem Kursivdruck geschrieben und mit * markiert.

6.4.3 Überblick über die statistische Auswertung von GSSG

Zeit (h)	Getestete Gruppen	Versuchsanzahl (n)	Kolmogorow-Smirnov D / D kritisch	Kolmogorow-Smirnov P	Mittelwert	Standardabweichung	t test (p-Wert)	Erforderliches Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur
0,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	10	0,18 / 0,41 0,14 / 0,26	0,90 0,66	0,68 0,91	0,31 0,36	0,0792	0,0401
0,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,14 / 0,46 0,14 / 0,26	0,998 0,66	0,79 0,91	0,42 0,36	0,4324	0,0421
0,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,12 / 0,38 0,14 / 0,26	0,99 0,66	0,83 0,91	0,42 0,36	0,5612	0,0383
0,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	12	0,18 / 0,38 0,14 / 0,26	0,82 0,66	0,71 0,91	0,24 0,36	0,0860	0,0383
0,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,30 / 0,46 0,14 / 0,26	0,48 0,66	0,85 0,91	0,34 0,36	0,6656	0,0421
0,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,24 / 0,46 0,14 / 0,26	0,77 0,66	1,14 0,91	0,12 0,36	0,0967	0,0421
0,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,22 / 0,52 0,14 / 0,26	0,93 0,66	0,91 0,91	0,11 0,36	0,9756	0,0442
0,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	5	0,23 / 0,57 0,14 / 0,26	0,96 0,66	0,97 0,91	0,13 0,36	0,7076	0,4524
1,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	12	0,23 / 0,38 0,07 / 0,26	0,54 0,999	0,90 0,91	0,24 0,33	0,9008	0,0383
1,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,21 / 0,46 0,07 / 0,26	0,88 0,999	0,80 0,91	0,29 0,33	0,4236	0,0421
1,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,17 / 0,38 0,07 / 0,26	0,87 0,999	0,89 0,91	0,36 0,33	0,9026	0,0383
1,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	10	0,18 / 0,41 0,07 / 0,26	0,92 0,999	0,82 0,91	0,27 0,33	0,4696	0,0401
1,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,19 / 0,46 0,07 / 0,26	0,93 0,999	0,87 0,91	0,13 0,33	0,7672	0,0421
1,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	8	0,19 / 0,46 0,07 / 0,26	0,94 0,999	1,19 0,91	0,39 0,33	0,0836	0,0421
1,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,27 / 0,52 0,07 / 0,26	0,77 0,999	0,67 0,91	0,28 0,33	0,1203	0,0442
1,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	6	0,21 / 0,52 0,07 / 0,26	0,96 0,999	0,86 0,91	0,14 0,33	0,7549	0,0442
3,5	P ⁻⁴ M / Kontrolle	13	0,18 / 0,36 0,18 / 0,28	0,78 0,41	0,72 1,06	0,18 0,66	0,0833	0,0374
3,5	P ⁻⁵ M / Kontrolle	8	0,30 / 0,46 0,18 / 0,28	0,78 0,41	1,00 1,06	0,64 0,66	0,8506	0,0442
3,5	CRH ⁻⁵ M / Kontrolle	12	0,22 / 0,38 0,18 / 0,28	0,58 0,41	0,89 1,06	0,39 0,66	0,4433	0,0383

3,5	CRH ⁻⁶ M / Kontrolle	12	0,15 / 0,38 0,18 / 0,28	0,96 0,41	0,91 1,06	0,39 0,66	0,4828	0,0383
3,5	A ⁻⁶ M / Kontrolle	8	0,22 / 0,46 0,18 / 0,28	0,83 0,41	1,60 1,06	0,65 0,66	0,0522	0,0442
3,5	A ⁻⁷ M / Kontrolle	7	0,25 / 0,49 0,18 / 0,28	0,75 0,41	1,59 1,06	0,43 0,66	0,0709	0,0431
3,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁶ M / Kontrolle	6	0,24 / 0,52 0,18 / 0,28	0,87 0,41	0,84 1,06	0,18 0,66	0,4399	0,0442
3,5	CRH ⁻⁶ M Block mit A ⁻⁷ M / Kontrolle	6	0,24 / 0,52 0,18 / 0,28	0,87 0,41	0,68 1,06	0,21 0,66	0,1828	0,0442

Tab 7:

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Fallzahl der durchgeführten Experimente zur Bestimmung des GSSG, die angewandten statistischen Tests und die Ergebnisse der Tests in Kurzfassung. Signifikante Werte sind in fettem Kursivdruck geschrieben und mit * markiert.

7. Diskussion

7.1 Diskussion der verwendeten Methoden

7.1.1 HMEC-1 Endothelzelllinie

Das Modell der Endothelzellkultur (endotheliale Zelllinie), das in dieser Arbeit verwendet wurde, eignet sich als standardisiertes Verfahren mit guter Materialverfügbarkeit und praktikablem „Handling“ für die Bearbeitung der gestellten Fragen. Eine Kontamination der Kultur konnte durch striktes steriles Arbeiten in der Lamina flow-Sterilbank verhindert werden. Nach Einsäen der gewonnen Zellen wurden die Zellen bebrütet, nach 2 Tagen bildete sich eine Zellmonolayer aus, die Zellvermehrung stagnierte (Endothelzellen vermehren sich in Kultur so lange bis ein Zellrasen gebildet ist). Um sicher zu sein, dass eine Monokultur vorlag, wurde die typische Morphologie der Endothelzellen mit Bildung eines Pflastersteinreliefs aus homogenen, etwa gleich großen (35x50µm) poliklonalen Zellen gefordert. Als weitere Positivkontrolle wurde die endotheliale Endothelinfreisetzung bestimmt, die in unseren Kontrolluntersuchungen stets zeitabhängig positiv war.

7.1.2 Tietze-Methode zur GSH-GSSG-Bestimmung

Das GSH-GSSG-System ist ein sehr wichtiges System für die Regelung vieler Zellfunktionen (Dickinson et al 2002) und stellt zudem ein Modell zur Erforschung eines Teilaspektes von oxidativem Stress dar. Der Körper ist ständig den verschiedensten oxidativen Stimuli ausgesetzt (Camera et al 2002), wodurch es zu Bildung von möglichen toxisch wirkenden ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies) kommt. Es ist bekannt, dass dieser Mechanismus Ursache für diverse Erkrankungen darstellt, beispielhaft sei hier die Atherosklerose genannt (Andreassi 2003).

Daher wird den körpereigenen Abwehrmechanismen, einer der Wichtigsten ist dabei das GSH-GSSG-System (Wassermann et al 2004), und deren Erforschung ein großer Stellenwert beigemessen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren viele unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von GSH und GSSG entwickelt (Camera et al 2002). Dabei kann man zwischen nicht trennenden Methoden wie Spektrophotometrie oder Spektrofluorometrie und chromatografischen Methoden wie HPLC oder kapillar-elektrophoretischen Methoden unterscheiden. Die chromatografischen Methoden besitzen eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität, außerdem

ist es hier teilweise möglich, mehrere Proben gleichzeitig zu analysieren, was eine Zeitersparnis bringt (Camera et al 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete photospektroskopische Methode zur Messung von GSH und GSSG wurde 1969 von Tietze entwickelt (Tietze 1969). Diese Methode wurde ausgewählt, weil sie eine einfache, schnell durchzuführende und gut etablierte Methode ist mit der auch kleine Mengen an GSH detektiert werden können (Tietze et al 1969). Die Messungen im Photometer sind bei sorgfältiger Durchführung sehr genau und gut reproduzierbar. Die für das Verfahren benötigten Geräte waren in unserem Labor bereits vorhanden, so dass die Methode sehr kostengünstig praktikabel war.

Im Vergleich zu den oben genannten chromatografischen Verfahren hat diese Methode allerdings den Nachteil, dass sie eine geringere Spezifität und Selektivität zu besitzen. So kann GSH durch die Tietze-Methode nicht elektiv von anderen in der Zelle vorkommenden Thiolen oder anderen Molekülen, die möglicherweise die Reaktion stören könnten, unterschieden werden. Als Konsequenz hieraus können ungenaue (falsch positive, aber auch falsch negative) Messergebnisse erhoben werden (Camera et al 2002).

Alle diese Methoden erfordern eine sorgfältige Vorbereitung der Proben, wobei die Verhinderung der Auto-Oxidation des GSH der entscheidende Punkt ist. Ein weiteres Problem ergibt sich beim Zusammentreffen von GSSG mit Protein. Durch Proteolyse wird das GSSG abgebaut, wobei seine Halbwertszeit auf unter 2 Minuten verringert wird (Senft et al 2000). Aus diesem Grund war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, extrazelluläre Konzentrationen von GSSG zu bestimmen, da das Aminosäuren-enhaltende Zellkulturmedium GSSG sofort abgebaut hätte. Im Folgenden wurde daher nur intrazelluläres GSSG untersucht.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 mRNA- Nachweis für CRHR2

Es gibt zwei Gene, die für die beiden Subtypen des CRH-Rezeptors kodieren (CRHR1 und CRHR2 _{α,β,γ}) (Kostich et al 1998), welche sich in ihrem pharmakologischen Profil und in ihrer Lokalisation im Körper unterscheiden (Smagin et al 2000). Dabei befindet sich der CRHR1 vornehmlich im ZNS mit hoher Expression im Kortex, dem Hippokampus und der Amygdala (Coste et al 2002,

Potter et al 1994). Ebenso wurde der CRHR2_γ bisher nur im humanen ZNS nachgewiesen (Kostich et al 1998).

Im Gegensatz hierzu konnten CRHR2_α und CRHR2_β auch in peripheren Geweben gefunden werden, beispielhaft sei hier das Myokard genannt.

Unsere These war daher, dass auch auf den HMEC-1 CRHR2 exprimiert werden, die eine Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-Redoxsystem vermitteln könnten. Um unsere These zu bestätigen wurden PCR-Experimente nach standardisierten, gut etablierten Protokollen durchgeführt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie spezifisch für den CRHR2 kodieren, ohne Spezifität für eine Splicevariante. Als zusätzliche „Qualitätskontrolle“ erfolgte die Sequenzierung des PCR-Produktes.

In dieser Dissertation gelang der Nachweis von CRHR2-mRNA mittels PCR. Zusätzlich konnte unsere Arbeitsgruppe in einem Projekt ausserhalb dieser Dissertation den CRHR2-Rezeptor auf der Zelloberfläche der verwendeten humanen Endothelzelllinie auf Proteinebene mittels FACS-Analyse nachweisen.

Der Nachweis von CRHR1 mRNA konnte im Gegensatz dazu nicht erbracht werden.

7.2.2 Rezeptorspezifische Wirkung von CRHR2 und CRHR1

Rezeptoren auf die Zelle

Die hier beobachtete Veränderung in der Homeostase des GSH-GSSG-Systems durch extrahypothalamisches CRH ist durch eine CRHR2-Rezeptor vermittelte Wirkung zu erklären, da nur CRHR2-mRNA sowie die Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Endothelzellen mittels FACS-Analyse gelang während der Subtyp R1 nicht nachweisbar war (wie bereits unter 7.2.1 dargestellt).

Die Hypothese einer CRHR2-vermittelten proatherosklerotische Wirkung von CRH kann zudem unterstützt werden durch Arbeiten von Wilbert-Lampen an humanen Endothelzellen wie an primären Monozyten. Beide Zielzellen zeigten unter Einfluß von CRH eine deutliche Stimulation der Endothelinfreisetzung während die NO-Bildung unbeeinflussbar blieb (Nettoeffekt: Vasokonstriktion). Zudem konnte gezeigt werden, daß es unter Einfluß von CRH zu einer Zunahme der Adhäsion von Monozyten am Endothel kommt, eine ebenfalls proatherosklerotische Wirkung von CRH (Wilbert-Lampen et al. 2006). Alle aufgeführten Experimente wurden mittels Einsatz eines CRH-Rezeptorantagonisten komplett aufgehoben (Wilbert-Lampen et al 2006).

Somit scheint wahrscheinlich, daß der Effekt von CRH abhängig ist von der Lokalisation (zentral oder peripher) sowie von der Bindung an den jeweiligen Rezeptortyp (Subtyp R1- oder R2). Diese Hypothese wird auch durch die Arbeit von Cantarella bestätigt, welche unterschiedliche Effekte von CRHR1 und CRHR2 auf die endotheliale NO-Synthetase darstellen konnte (Cantarella et al 2001). In diesem Zusammenhang ist vergleichend der Wirkmechanismus der Katecholamine zu nennen, deren Wirkung ebenfalls von der Lokalisation (Gefäßperipherie, Lunge, Myokard) oder von der Bindung an den jeweiligen Rezeptortyp (α -, β 1/2-Rezeptor) abhängt.

Zusammenfassend kann somit angenommen werden, daß die Effekte von CRH sowohl proatherogen als auch (neuro)protektiv sind, abhängig von der Lokalisation und der Stimulation des entsprechenden CRH-Rezeptortyps.

7.2.3 Paraquat

Paraquat ist ein in der Literatur etablierter Induktor von oxidativen Prozessen und wird daher als Model für oxidativen Stress eingesetzt (Takenaka et al 2003). Nach Aufnahme in die Zelle wird Paraquat intrazellulär prozessiert, wodurch es einerseits zur Bildung von H_2O_2 , andererseits zur Entstehung anderer ROS (Reaktiver Sauerstoffspezies) kommt (Bus et al 1984).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob CRH die Homeostase des GSH-GSSG-Systems verändern kann. Das GSH-GSSG-System wurde gewählt, da es eines der wichtigsten Systeme für die Abwehr von oxidativem Stress darstellt (Wassermann et al 2004).

CRH entfaltet, ähnlich wie Paraquat, seine Wirkung nach Aufnahme in die Zelle, also intrazellulär, eine mögliche konzentrationsabhängige Schädigung der Zellwand sollte dadurch vermieden werden (Kageyama et al 2002).

Daher war die erst intrazellulär erfolgende Prozessierung von Paraquat zu H_2O_2 das entscheidende Auswahlkriterium für die Wahl als Positivkontrolle.

Paraquat durchläuft in der Zelle selbst einen Redoxzyklus, wodurch H_2O_2 entsteht. Ein Teil des H_2O_2 wird durch andere Abwehrsysteme wie die Superoxiddismutase und die Katalase zu Wasser abgebaut und damit entgiftet (Stocker et al 2004). Der nicht abgebaute Teil nimmt dann Einfluss auf das GSH-GSSG-Redoxsystem. So wird GSH von H_2O_2 oder anderen Peroxidasen zu GSSG oxidiert (Pullar et al 2001), diese Reaktion führt dann zu einer erhöhten Konzentration von GSSG. Die durch

H₂O₂ erhöhte GSSG-Konzentration verkleinert das Verhältnis von GSH/GSSG (Benzi et al 1990).

Beispielhaft eine Reaktionsfolge, beeinflusst durch Paraquat:

In der Literatur wird nach Gabe von Paraquat (LD₅₀) ein signifikanten Abfall von GSH in der Leber beschrieben, zudem kann bei einer mit Paraquat perfundierten Lunge eine Erhöhung der GSSG-Konzentration gemessen werden (Dunbar et al 1984).

Im Gegensatz hierzu wurde in unseren Experimenten eine Erhöhung des Gesamt-GSH sowie des GSH berechnet bei gleichbleibenden GSSG-Konzentrationen gemessen. Konsekutiv ist somit das Mengenverhältnis von GSH / GSSG vergrößert anstatt erwartungsgemäß verkleinert, was im Umkehrschluss bedeutet, dass es neben dem H₂O₂-abhängigen Mechanismus einen weiteren H₂O₂-unabhängigen Mechanismus geben muss. Hinweise auf das Vorliegen einer solchen Wirkung sind Arbeiten von Benzi und Tsukamoto, die eine steigende Konzentration von GSH bei praktisch unveränderter GSSG-Konzentration nach Paraquatgabe und damit ein erhöhtes Verhältnis von GSH zu GSSG zeigen konnten (Tsukamoto et al 2002, Benzi et al 1990). Tsukamoto wies zeitgleich zur Erhöhung der GSH-Konzentration eine erhöhte Aktivität der GR nach (Tsukamoto et al 2002), ein Enzym, das im GSH-GSSG-System für das Recycling des GSH durch Reduktion von GSSG zuständig ist (Anderson 1997). Demnach kommt es durch die gesteigerte Aktivität von GR zu einer vermehrten Rückreduktion von GSSG zu GSH, wodurch die Erhöhung des GSH bei gleichbleibenden GSSG erklärt werden könnte. Allerdings ist bisher noch ungeklärt, ob die Steigerung der GSH-Konzentration und der zeitgleiche Anstieg der GR-Aktivität ursächlich miteinander in Verbindung stehen oder nur zufällig parallel verlaufen.

Eine weitere mögliche Erklärung könnten die bei der intrazellulären Prozessierung von Paraquat zusätzlich zum H₂O₂ gebildeten ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies) sein, da bekannt ist, dass eine adaptive Anpassung der Zelle an ROS in einer Erhöhung des zellulären GSH-Pools resultiert (Cho et al 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus ist eine erhöhte Expression von γ -Glutamylcystein-Synthetase durch ROS. Dieses Enzym stellt den limitierenden Schritt in der Neusynthese von GSH dar (Shi et al 1994), bei erhöhter Aktivität von γ -Glutamylcystein-Synthetase wird somit verhältnismäßig mehr GSH pro Zeiteinheit neu synthetisiert als von der GPX zu GSSG oxidiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir nur nach 0,5 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen den mit Paraquat stimulierten Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle messen. Obwohl sich auch nach 1,5 und 3,5 Stunden Inkubationszeit die Konzentrationen von GSH in den stimulierten Proben im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle noch erhöht darstellten, waren diese Unterschiede nur tendenziell und statistisch nicht mehr signifikant.

Ein Erklärungsmechanismus hierfür wäre, dass durch die Stimulation mit Paraquat bei kurzer Inkubationszeit von 0,5 Stunden das GSH-GSSG-System akut zu hoher Aktivität angeregt wurde, während nach längerer Inkubationszeit (1,5 beziehungsweise 3,5 Stunden) das System bereits einen Teil der durch Paraquat ausgelösten Veränderungen in der Redoxhomeostase in Form von H_2O_2 und / oder ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies) abgebaut hat, so dass keine so ausgeprägte Aktivität des Abwehrsystems von Nöten ist.

Eine weitere Erklärung für die bei längerer Inkubation fehlende signifikante Zunahme des Gesamt-GSH und des GSH berechnet könnte sein, dass sowohl GSH als auch GSSG aktiv von der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert wurde (Akerboom et al 1982), wodurch die intrazellulären Konzentration von GSH und GSSG sich nicht wesentlich verändern.

Wie bereits oben aufgeführt, wurde in unserer Arbeit ein Medium verwendet, das Aminosäuren enthält. Diese vermögen einen Abbau von GSH und GSSG auszulösen, wodurch in unserem Modell keine extrazelluläre Messung der GSH- und GSSG-Konzentrationen möglich war. Ein aminosäurefreies Medium konnte nicht verwendet werden, da kultivierte Endothelzellen diese zum Wachstum benötigen. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Export von GSH und GSSG in den extrazellulären Raum stattfindet, von uns aber nicht erfasst werden kann.

Eine weitere Erklärung für die nur bei 0,5 Stunden Inkubationszeit gesehene signifikante Zunahme von Gesamt-GSH und berechnetem GSH könnte eine durch Paraquat induzierte Apoptose sein mit Verlust der Enzymaktivität und Zellintegrität (Tsukamoto et al 2002).

Diese Erklärung ist für unsere Ergebnisse jedoch eher unwahrscheinlich, da regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolluntersuchungen der verwendeten Endothelzellen keinerlei Hinweise auf eine Zellschädigung wie Ablösung der Zellen, Veränderung der Zellmorphologie oder Eindringen von Trypanblau als Marker eines Zelltodes aufwiesen. Außerdem wurden in den Dosiswirkungsversuchen nur für

Paraquatkonzentrationen von 10^{-3}M zellschädigende Wirkungen (siehe oben) beobachtet, während Konzentrationen von 10^{-6}M bereits keinerlei signifikante Veränderungen mehr aufwiesen. Zudem ist bekannt, dass der Prozess der Apoptose länger als unsere Inkubationszeit andauert; So lagen bei der Studie von Tsukamoto zwischen den ersten Anzeichen einer Systemdysfunktion und dem endgültigen Zelltod mehr als 8 Stunden (Tsukamoto et al 2002).

7.2.4 CRH

Seit der Entdeckung des CRH (1981) als Hauptmediator der HPA-Achse, wurden im Verlauf neben der zentralen Funktion immer neue periphere Wirkmechanismen entdeckt (Vale et al 1981, Coste et al 2002). Neben seiner Rolle in der chronischen Stressantwort verfügt es über eine regulierende Wirkung des Immunsystems. Daneben wird CRH eine Beteiligung in der Pathogenese verschiedenster Krankheitsbilder zugeschrieben, genannt seien hier insbesondere psychiatrische Erkrankungen wie die Depression aber auch die Atherogenese (Ströhle et al 2003, Black et al 2002). Welchen pathophysiologischen Mechanismus CRH in der Induktion oder Progression auslöst ist nicht hinreichend geklärt. Interaktionen, welche die Hyperaktivität der HPA-Achse auslösen, scheinen immer wahrscheinlicher. So werden heute erste medikamentöse Therapieversuche mit einem CRHR1-Rezeptorantagonisten durchgeführt, die einen positiven Einfluss auf das Ausmaß der Depression zu haben scheinen (Holsboer 1999). In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass es bei depressiven Patienten zu einer Progression der Atherosklerose bis hin zum akuten Herzinfarkt oder plötzlichen Herztod kommt, eine Verbindung beider Krankheitsbilder könnte die Hyperaktivierung der HPA-Achse mit konsekutiver CRH-Erhöhung sein (Kehne et al 2002, Poltsky 1998).

Die Bedeutung des CRH in der Atherogenese ist bislang nicht ausreichend erklärt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CRH eine Imbalance der endothelialen Vasokonstriktion / Vasodilatation auslösen kann mit dem Nettoeffekt einer Vasokonstriktion (Wilbert-Lampen et al, 2006a, 2006b).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht auf welche Weise CRH das GSH-GSSG-System beeinflusst was nachfolgend zur Induktion einer Endotheldysfunktion führen kann.

Die in den Stimulations- und Antagonisierungsversuchen eingesetzten CRH-Konzentrationen (10^{-5}M und 10^{-6}M) erscheinen hoch. Dazu ist zu sagen, dass es keinen etablierten „Normalwert“ von Plasma- oder Liquor-CRH-Konzentrationen gibt wegen fehlenden normierten Nachweismethoden für CRH. Daraus folgend sind die in der Literatur aufgeführten „physiologischen“ CRH-Konzentrationen je nach der verwendeten Messmethode deutlich schwankend (zwischen 10^{-11}M und 10^{-6}M) (Rückert et al 1990). Diese stark variierenden Angaben hängen neben den bereits erwähnten Unterschieden in der angewendeten Messmethode auch mit der Anwesenheit von CRH-abbauenden Enzymen zusammen, deren Quantität in unterschiedlichen Situationen nicht geklärt ist. Zudem werden diese CRH-Fragmente von den verschiedenen Messmethoden unterschiedlich erfasst (je nach Güte des verwendeten Antiserums), was letztendlich die Spannweite der Normwerte erklärt (Linton et al 1987).

Schlussendlich ist bekannt, dass die lokalen CRH-Spiegel deutlich erhöht sind im Vergleich zu den gemessenen Plasmakonzentrationen, was die parakrine Funktion des peripheren CRH unterstreicht (Clifton et al 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass es nach Inkubation mit CRH über 1,5 Stunden zu einer Modifikation des GSH-GSSG-Systems kommt mit konsekutivem signifikantem GSH-Abfall bei gleichbleibender GSSG-Konzentration. Hierfür seien im Folgenden mehrere mögliche Erklärungen aufgeführt:

Erstens vermag eine CRH-Stimulation das GSH-GSSG-System zu aktivieren, wodurch GSH über die GPX zu GSSG oxidiert wird, welches anschließend aktiv über die Zellmembran in den extrazellulären Raum exportiert wird (Camera et al 2002). Bei einer wie in dieser Arbeit erfolgten intrazellulären GSSG-Bestimmung kann somit dieses exportierte GSSG nicht erfasst werden. Dadurch werden gleichbleibende GSSG-Spiegel intrazellulär bestimmt, bei aber abnehmender GSH-Konzentration, was auf eine Verschiebung des Redoxgleichgewichts zu Gunsten von GSSG hinweist.

Zweitens kann es zu einer weiteren Oxidation des GSSG zu Glutathionthiosulfonat kommen (Pullar et al 2001), wodurch das GSH durch die Reaktion über die GPX ständig verbraucht würde, bei gleichbleibender GSSG-Konzentration.

Drittens können neben der enzymatischen Umwandlung von GSH in GSSG noch zusätzliche nicht-enzymatische Oxidationsreaktionen für das GSH ablaufen, wobei dann neben GSSG noch andere Reaktionsprodukte wie zum Beispiel GSO_3H oder GSO_2NH_2 entstehen (Camera et al 2002).

Die in dieser Arbeit dokumentierte Verschiebung des Mengenverhältnisses von GSH zu Gunsten des GSSG wird in der Literatur als ein wichtiger Prädiktor für das Vorhandensein von oxidativem Stress gewertet. (Cogger et al 2004, Annuk et al 2001, Sanchez-Campos et al 1999). In der vorliegenden Arbeit kann dies jedoch nicht vorbehaltlos in diesem Sinne betrachtet werden, da die Verschiebung des Mengenverhältnisses bei 1,5 Stunden nicht durch eine Steigerung der GSSG-Konzentration, sondern vielmehr durch eine Reduktion der GSH-Konzentration bedingt ist.

Für eine Reduktion der GSH-Konzentration kommen folgende Gründe in Frage:

Eine Hemmung der Biosynthese des GSH durch CRH. Um diese Hypothese zu bestätigen sollten zusätzliche Versuche zur Inhibition der GSH-Biosynthese z.B. durch BSO durchgeführt werden (Anderson 1998). So könnte differenziert werden, ob lediglich eine Hemmung der GSH-Biosynthese erfolgt oder zusätzlich eine GSH-Depletion induziert wird. Zudem kommt eine Erhöhung der Zellpermeabilität durch eine zelltoxische Wirkung des CRH in Frage. Dies ist aber aus diversen Gründen eher unwahrscheinlich. Erstens wurden in den Versuchen zur Bestimmung der Dosiswirkungskurven jeweils Kontrollen zur Zellvitalität mittels Trypanblau durchgeführt, welche jeweils keine Hinweise auf Schädigung der Zellen ergaben. Zweitens werden auch in der Literatur Versuchsreihen beschrieben, in denen regelmässige Vitalitätskontrollen unter Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Hierbei wurden die selben CRH-Konzentrationen verwendet wie in der vorliegenden Arbeit. Die Vitalität der Zellen betrug hier immer >99% (Cantarella et al 2001). Drittens ist der Effekt nach 3,5 Stunden bereits wieder aufgehoben. Sollte eine Zellschädigung der Grund für die Reduktion der intrazellulären GSH-Konzentration sein, wäre eine Erholung der Zelle unter weiterbestehender Stimulation mit dem toxischen Agens nicht zu erwarten.

Von den 3 gewählten Inkubationszeitpunkten waren die kurze Inkubationszeit von 0,5 Stunden sowie die längere Inkubationszeit von 3,5 Stunden ohne Modulation des GSH-GSSG-Systems. Eine mögliche Erklärung für die Nichtsignifikanz bei der

kurzen Inkubationszeit wäre, dass dieser kurze Zeitraum nicht ausreicht, um das Redoxsystem zu aktivieren. Dass nach einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden keine signifikante Stimulation mehr nachweisbar ist, könnte durch eine vermehrte Ausschleusung der beteiligten Metabolite in den extrazellulären Raum erklärbar sein (Akerboom et al 1982).

Zusammenfassend konnte eine CRH-induzierte Veränderung der GSH-GSSG-Homeostase in der Zelle nachgewiesen werden. Diese stellt einen Teilaspekt zur Beurteilung von oxidativem Stress in der Zelle dar mit möglicher Modulation unterschiedlichster Zellfunktionen (Valko et al 2007) bis hin zur einer endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose (Valko et al 2007).

7.2.5 Astressin

Um zu überprüfen, ob die gemessenen Effekte von CRH auf das GSH-GSSG-System tatsächlich über den CRH-Rezeptoren vermittelt werden, wurden Antagonisierungsversuche durchgeführt. Hierfür wurde Astressin, ein in vitro hochpotenter CRH-Rezeptor-Antagonist, der mit gleicher Affinität an CRHR2 und CRHR1 bindet, gewählt. Zunächst wurde gezeigt, dass Astressin keine eigene pharmakologische Wirkung auf das GSH-GSSG-System ausübt. Anschließend konnte in den Antagonisierungsversuchen belegt werden, dass Astressin tatsächlich die Effekte von CRH auf das Redoxsystem blockieren kann.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die antagonistische Wirkung des Astressins dabei dosisabhängig ist (Broadbear et al 2004, Brauns et al 2001). Betrachtet man die Einzelkomponenten des GSH-GSSG-Systems isoliert, scheint diese konzentrationsabhängige Antagonisierung zunächst nicht gegeben zu sein. So blockiert das Astressin in einer Konzentration von 10^{-6} M die durch CRH-induzierte Reduktion des GSH zwar insoweit, dass keine Signifikanz mehr vorliegt, aber scheinbar weniger ausgeprägt als bei Astressin in einer Konzentration von 10^{-7} M.

Vergleicht man jedoch nun das Zusammenspiel der Einzelkomponenten durch Betrachtung des Mengenverhältnisses von GSH zu GSSG stellt man fest, dass die Blockierung - wie erwartet - dosisabhängig ist.

Zusammenfassend zeigen unsere Antagonisierungsversuche, dass die Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-Redoxsystem tatsächlich über CRH-Rezeptoren vermittelt wird.

7.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte belegen, dass CRH die Homeostase des GSH-GSSG-Systems von Endothelzellen verändert, vermittelt über CRH-Rezeptor-Subtyp 2. Dabei wurden die intrazellulären Konzentrationen von GSH und GSSG und deren Verhältnis zueinander zu Gunsten des GSSG verschoben. In ergänzenden Projekten könnte versucht werden, die Konzentrationsminderung von GSH genauer zu untersuchen. Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, ob eine reine Hemmung der GSH-Biosynthes vorliegt oder ob der oben beschriebene Effekt auf das GSH zusätzlich zu einer Depletion des intrazellulären GSH führt. In diesem Zusammenhang wäre es auch sinnvoll, die GSH- und GSSG-Konzentrationen im extrazellulären Raum zu messen, um noch genaueren Einblick in die Reaktion des GSH-GSSG-Redoxsystems auf den Stressor CRH zu erhalten. Hierzu wäre es notwendig, ein aminosäuren- und proteinfreies Medium zu entwickeln, das einerseits das Überleben der Zellen gewährleistet, andererseits aber auch die Messung von GSH und GSSG erlaubt.

Zudem wäre es interessant zu untersuchen, welche Schäden durch eine CRH-induzierte Veränderung der GSH-GSSG-Synthese an der Zelle entstehen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zum Beispiel die Lipidperoxidation mit Hilfe der Konzentrationen von oxLDL in der Zelle zu untersuchen.

In der Klinik gibt es bereits erste klinische Studien zur Behandlung von Depressions- und Angsterkrankungen einen CRHR1-Antagonisten einzusetzen (Grigoriadis 2003). In Anlehnung an die vorgestellte Arbeit ergibt sich ein weiterer Ansatzpunkt für die Behandlung mit einem CRH-Antagonisten, nämlich die Verhinderung einer durch CRH bedingten Veränderung der GSH-GSSG-Homeostase mit deren möglichen negativen Folgen auf die Endothelzellfunktion.

8. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass mentaler Stress bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit einer erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate einhergeht. Zusätzlich wurde eine Verbindung zwischen chronischem Stress und einem ausgeprägteren Fortschreiten der Atherogenese beobachtet. Die daran beteiligten Mechanismen sind heute noch nicht genau erforscht. Eine mögliche Verbindung wird in der Überaktivierung der HPA-Achse mit konsekutiv vermehrter Ausschüttung des Hauptmediators CRH gesehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob CRH die GSH-GSSG-Homeostase verändern kann und somit zu einer Schädigung der Endothelzellfunktion führt.

Hierzu wurde zunächst die mRNA des CRH-Rezeptor-Subtyp 2 in humanen Endothelzellen (HMEC-1) nachgewiesen und anschliessend (ausserhalb dieser Dissertation) die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche mittels FACS bestätigt.

Anschließend wurde die Wirkung von CRH auf das GSH-GSSG-Redoxsystem untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Abfall der GSH-Konzentration bei gleichbleibender GSSG-Konzentration. Um darzustellen, dass CRH diese Veränderungen in der GSH-GSSG-Homeostase (CRH-Rezeptor-vermittelt) induzieren kann, wurden Antagonisierungsversuche mit Astressin, einem hochpotenten CRH-Rezeptor-Antagonisten mit gleicher Affinität zu CRHR1 und CRHR2, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass CRH zu einer konzentrationsabhängigen Blockierung der CRH-Effekte führt.

Die Zusammenschau aller oben beschriebener Effekte zeigt erstmals eine CRH-induzierte Veränderung der GSH-GSSG-Homeostase, vermittelt über den auf der HMEC-1-Zelllinie erstmalig auf mRNA-Ebene nachgewiesenen CRH-Rezeptor-Subtyp 2.

Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, einen weiteren Pathomechanismus zwischen chronischem Stress und der Genese der Atherosklerose zu verstehen.

9. Verwendete Abkürzungen

A	Astressin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BCA	bicinonic acid
BSA	bovines Serum Albumin
BSO	Buthioninsulfoxamin
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CRHR1	CRH-Rezeptor-Subtyp1
CRHR2	CRH-Rezeptor-Subtyp 2
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTNB	5,5 Dithio-bis-nitrobenzoesäure
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid, oxidiertes Glutathion
GR	Glutathion Reduktase
HMEC-1	Humane Microvascular Endothelium Cells
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
NEM	N-Ethylmaleimid
NF _{κB}	Nekrose Faktor κB
NO	Stickstoffoxid
oxLDL	oxidiertes low-density lipoproteine
P	Paraquat
PBS	Phosphat- buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVN	paraventriculärer Nukleus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAMS	Sympatho-adrenomedulläres System
TNB	Thio-bis-nitrobenzoesäure

10. Literaturverzeichnis

- Anderson M.E.:** Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* 1998;24(111-112):1-14
- Ades E.W., Candal F.J., Swerlick R.A., George V.G., Summers S., Bosse D.C., Lawley T.J.:** HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. *J Invest Dermatol.* 1992;99(6):683-690
- Aguilera G., Rabadan-Diehl C.:** Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept.* 2000;96(1-2):23-29
- Akerboom T.P., Bilzer M., Sies H.:** The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem.* 1982;257(8):4248-4252
- Anderson M.E.:** Glutathione and Glutathione Delivery Compounds. *Adv Pharmacol.* 1997;38:65-78
- Andreassi M.G.:** Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutation Research.* 2003;543:67-86
- Andreis P., Neri G., Nussdorfer G.:** CRH directly stimulates corticosterone secretion by the rat adrenal gland. *Endocrinology* 1991;128(2):1198-1200
- Annuk M., Zilmer M., Lind L., Linde T., Fellstrom B.:** Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(12):2747-2752
- Arborelius L., Owens M.J., Plotsky P.M., Nemeroff C.B.:** The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol.* 1999;160(1):1-12
- Arrigo A.P.:** Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;27(9/10):936-944
- Bale T.L., Giordano F.J., Hickey R.P., Huang Y., Nath A.K., Peterson K.L., Vale W.W., Lee K.F.:** Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7734-7739

- Bale T.L., Vale W.W.:** CRF and CRF Receptors: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:525–57
- Barefoot J., Schroll M.:** Symptoms of Depression, Acute Myocardial Infarction, and Total Mortality in a Community Sample. *Circulation.* 1996;93(11):1976-1980
- Benzi G., Marzatico F., Pastoris O., Villa R.F.:** Influence of Oxidative Stress on the Age-Linked Alterations of the Cerebral Glutathione System. *J Neurosci Res.* 1990;26(1):120-128
- Bierhaus A., Wolf J., Anrassy M., Rohleder N., Humpert P.M., Petrov D., Ferstl R., von Eynatten M., Wendt T., Rudofsky G., Joswig M., Morcos M., Schwaninger M., McEwen B., Kirschbaum C., Nawroth P.P.:** A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1920-1925
- Black P.H.:** Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun.* 2002;16(6):622-653
- Brauns O., Liepold T., Radulovic J., Spiess J.:** Pharmacological and chemical properties of astressin, antisauvagine-30 and alpha-helCRF: significance for behavioural experiments. *Neuropharmacol.* 2001;41(4):507–516
- Broadbear J.H., Winger G., Rivier J.E., Rice K.C., Woods J.H.:** Corticotropin-releasing hormone antagonists, astressin B and antalarmin: differing profiles of activity in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacol.* 2004;29(6):1112-1121
- Bus J.S., Gibson J.E.:** Paraquat: Model for Oxidant-Initiated Toxicity. *Environ Health Perspect.* 1984;55:37-46
- Camera E., Picardo M.:** Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;781(1-2):181-206
- Cantarella G., Lempereur L., Lombardo G., Chiarenza A., Pafumi C., Zappala G., Bernardini R.:** Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. *British Journal of Pharmacology* 2001;134:837-844

- Carrasco G.A., Van de Kar L.D. :** Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):235-272
- Cho S., Hazama M., Urata Y., Goto S., Horiuchi S., Sumikawa K., Kondo T.:** Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:589-602
- Clifton V.L., Read M.A., et al.:** Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal-placental circulation: involvement of the nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(10):2888-93
- Cogger V.C., Muller M., Fraser R., McLean A.J., Khan J., Le Couteur D.G. :** The effects of oxidative stress on the liver sieve. *J Hepatol.* 2004;41(3):370-376
- Chrousos G.P., Gold P.W.:** The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA.* 1992;267(9):1244–1252
- Chrousos G.P.:** The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl. J Med.* 1995;333(14):942-943
- Chrousos G.P.:** Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;851:311–335
- Coste S.C., Quintos R.F., Stenzel-Poore M.P.:** Corticotropin-Releasing Hormone-Related Peptides and Receptors: Emergent Regulators of Cardiovascular Adaptations to Stress. *Trends Cardiovascular Med.* 2002;12(4):176-182
- Dautzenberg F.M., Hauger R.L.:** The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in Pharmacol Sci.* 2002; 23(2):71-77
- De Nigris F., Lerman A., Ignarro L.J., Williams-Ignarro S., Sica V., Baker A.H., Lerman L.O., Geng Y.J., Napolis C.:** Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2003;9(8):351-359
- DeSouza E.B., Grigoriadis D.E.:** Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 1995;20:789-819

- Dickinson D.A., Forman H.J.:** Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad. Sci.* 2002;973:488-504
- Dröge W., Schulze-Osthoff K., Mihm S., Galter D., Schenk H., Eck H.P., Roth S., Gmünder H.:** Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994;8:1131-1138
- Dunbar J.R., DeLucia A.J., Bryant L.R.:** Glutathione Status Of Isolated Rabbit Lungs. Effects of Nitrofurantoin And Paraquat Perfusion With Normoxic and Hyperoxic Ventilation. *Biochem Pharmacol.* 1984;33(8):1343-1348
- Eckart K., Radulovic J., Radulovic M., Jahn O., Blank O., Stiedl O., Spiess J.:** Actions of CRF and its Analogs. *Curr Med Chem.* 1999;6(11):1035-1053
- Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C.T.:** The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(3-4):132-149
- Gesing A., Bilang-Bleul A., Droste S.K., Linthorst A.C., Holsboer F., Reul J.M.:** Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing-hormone. *Neurosci.* 2001;21(13):4822-4829
- Getz G.S.:** Thematic review series: The Immune System and Atherogenesis. Immune function in atherogenesis. *J Lipid Res.* 2005;46(1):1-10
- Ghiadoni L., Donald A.E., Cropley M., Mullen M.J., Oakley G., Taylor M., O'Connor G., Betteridge J., Klein N., Steptoe A., Deanfield J.E.:** Mental Stress Induces Transient Endothelial Dysfunction in Humans. *Circulation.* 2000;102(20):2473-2478
- Ghibelli L., Fanelli C., Rotilio G., Lafavia E., Coppola S., Colussi C., Civitareale C., Ciriolo M.R.:** Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* 1998;12(6):479-486
- Gold P.W., Chrousos G.P.:** Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry.* 2002;7(3):254-275
- Grammatopoulos D.K., Chrousos G.P.:** Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trend Endocrin Metab.* 2002;13(10):436-444

- Granger C.B.:** Genetics of coronary heart disease: current understanding and future prospects. *Am Heart J.* 2000;140(4):S1–S2
- Grigoriadis D.E.:** Corticotropin-Releasing Factor Receptor Antagonists: Potential Novel Therapies for Human Disease. *Celltransmissions.* 2003;19(4):3-10
- Gulyas J., Rievier C., Perrin M., Koerber S.C., Sutton S., Corrigan A., Lahrchi S.L., Craig A.G., Vale W. and Rievier J.:** Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10575-10579
- Hall A.G.:** The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(3):238-245
- Harats D., Ben-Naim M., Dabach Y., Hollander G., Stein O., Stein Y.:** Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages, *Atherosclerosis.* 1989;79(2-3):245–252.
- Harbuz M.S., Lightman S.L.:** Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol.* 1992;134(3):327-339
- Hauser E.R., Pericak-Vance M.A.:** Genetic analysis for common complex disease. *Am Heart J.* 2000;140(4):36–44
- Heim C., Newport D.J., Heit S., Graham Y.P., Wilcox M., Bonsall R., Miller A.H., Nemeroff C.B.:** Pituitary-Adrenal and Autonomic Responses to Stress in Woman After Sexual and Physical Abuse in Childhood. *JAMA.* 2000;284(5):592-597
- Herman J.P., Prewitt C.M.F., Cullinan W.E.:** Neuronal Circuit Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Stress Axis. *Crit Rev Neurobiol.* 1996;10(3-4):371-394
- Hoffmeister H.M.:** Atherothrombose und Inflammation. *Z Kardiol.* 2001;90(6):379-384
- Holsboer F., von Bardeleben U, Buller R, Heuser I, Steiger A.:** Stimulation response to corticotropin-releasing-hormone (CRH) in patients with depression alcoholism and panic disorders. *Horm Metab Res Suppl.* 1987;16:80-88

- Holsboer F.:** CRH antagonists against depression. Viagra for the mind? *MMW Fortschr Med.* 1999; 12:141(49-50)
- Holsboer F.:** The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23(5):477–501
- Hong S.Y., Gil H.W., Yang J.O., Lee E.Y., Kim H.K., Kim S.H., Chung Y.H., Hwang S.K., Lee Z.W.:** Pharmacokinetics of Glutathione and Its Metabolites in Normal Subjects. *J Korean Med Sci.* 2005;20:721-726
- Jaeschke H, Mitchell JR.:** Use of Isolated Perfused Organs in Hypoxia and Ischämia/Reperfusion Oxidant Stress. *Method Enzymol.* 1990;186:752-759
- Jones D.P.:** Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8 (9-10):1865-879
- Jones D.N., Kortkaas R., Hatcher P.D., Middlemiss D.N., White A., Hagan J.J.:** Influence of peptide CRF receptor antagonists upon behavioural effects of human/rat CRF. *Eur J Pharmacol.* 1999;373(2-3):141-145
- Juruena M.F., Cleare A.J., Pariante C.M.:** The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(3):189-201
- Kageyama K., Gaudriault G.E., Suda T., Vale W.W.:** Regulation of corticotropin-releasing factor receptor type 2 β mRNA via cyclic AMP pathway in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2002;15(1):17-25
- Kasckow J.W., Baker D., Geraciotti T.D.Jr.:** Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides* 2001;22(5):845-851
- Keeling P.L., Smith L.L., Aldrige W.N.:** The formation of mixed disulphides in rat lung following paraquat administration. Correlation with changes in intermediary metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1982;716(2):249-257
- Keeling P.L., Smith L.L.:** Relevance of NADPH depletion and mixed disulfide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem Pharmacol.* 1982;31(20):3243-3249
- Kehne J., De Lombaert S.:** Non-peptidic CRF1 receptor antagonists for the treatment of anxiety, depression and stress disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2002;1(5):467-493

- Kimura Y., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Darnel A.D., Suzuki T., Ebina M., Nukiwa T., Sasano H.:** Expression of Urocortin and Corticotropin-Releasing Factor Receptor Subtypes in the Human Heart. *J Clin Endocrin Metabol.* 2002; 87(1): 340-346
- Kostich W.A., Chem A., Sperle K., Largent B.L.:** Molecular Identification and Analysis of a Novel Human Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Receptor: The CRF_{2γ} Receptor. *Mol Endocrin.* 1998;12(8):1077-1085
- Kwon Y.W., Masutani H., Nakamura H., Ishii Y., Yodoi J.:** Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol. Chem.* 2003;384 (7):991-996
- Lauterburg B.H., Adams J.D., Mitchell J.R.:** Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 1984;4:586-590
- Lenton K.J., Therriault H., Wagner J.R.:** Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 1999;274(1):125-130
- Leone A.:** Relationship between cigarette smoking and other coronary risk factors in atherosclerosis: risk of cardiovascular disease and preventive measures. *Curr Pharm Des.* 2003;9(29):2417-2423
- Libby P.:** Vascular Biology of Atherosclerosis: Overview and State of the Art. *Am J Cardiol.* 2003;91(suppl.):3A-6A
- Lidington E.A., Moyew D.L., McCormack A.M., Rose M.L.:** A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol.* 1999;7(4):239-246
- Linton E.A., McLean C., Nieuwenhuyzen Kruseman A.C., Tilders F.J., Van der Veen E.A. Lowry P.J.:** Direct measurement of human plasma corticotropin-releasing hormone by "two-site" immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(5):1047-53
- Loscalzo J.:** Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(5):1059-1061.
- Lovenberg T.W., Chalmers D.T., Liu C., DeSouza E.B.:** CRF_{2α} and CRF_{2β} rezeptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 1995;136(9):4139-4142

- Lowry P.J., Koerber S.C., Woods R.J., Baigent S., Sutton S., Behan D.P., Vale W., Rivier J.:** Nature of ligand affinity and dimerization of corticotrophin-releasing factor-binding protein may be detected by circular dichroism. *J Mol Endocrinol.* 1996;16(1):39–44
- Maas R., Boger R.H.:** Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(4):5-17
- Margolis A.M., Porasuphatana S., Rosen G.M.:** Role of Paraquat in the uncoupling of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Acta.* 2000;1524(2-3):253-257
- McEwen B.S., Stellar E.:** Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med.* 1993;153(18):2093-2101
- McNally J.S., Davis M.E., Giddens D.P., Saha A., Hwang J., Dikalov S., Jo H., Harrison D.G.:** Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6):H2290–H2297.
- Meaney M.J., Diorio J., Francis D., Widdowson J., Laplante P., Caldji C., Sharma S., Seckl J.R., Poltsky P.M.:** Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci.* 1996;18(1-2):49-72
- Meister A.:** Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. *Life Sci.* 1974;15(2):177-190
- Miller D.B., O'Callaghan J.P.:** Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.* 2002;51(6 Suppl 1):5-10
- Miranda A., Koerber S.C., Gulyas J., Lahrichi S.L., Craig A.G., Corrigan A., Hagler A., Rivier C., Vale W., Rivier J.:** Conformationally restricted competitive antagonists of human/rat corticotropin-releasing factor. *J Med Chem.* 1994;37(10):1450-1459
- Nakashima I., Takeda K., Kawamoto Y., Okuno Y., Kato M., Suzuki H.:** Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005;434:3-10
- Osiecki H.:** The Role of Chronic Inflammation in Cardiovascular Disease and its Regulation by Nutrients. *Altern Med Rev.* 2004;9(1):32-53
- Osterud B., Bjorklid E.:** Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1069-1112

- Pacak K:** Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol. Res.* 2000;49(Suppl.1):1069-1112
- Pacak K., Palcovits M.:** Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocr Rev.* 2001;22(4):502–548
- Pedrosa G.:** Aktuelles zur psychosomatischen und endokrinologischen Stressforschung. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005;130:102-106
- Perrin M.H., Sutton S.W., Cervini L.A., Rivier J.E., Vale W.W.:** Comparison of an Antagonist, Urocortin, and an Antagonist, Astressin, as Radioligands for Characterization of Corticotropin-Releasing Factor Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288(2):729-734
- Pignatelli D., Magalhaes M.M., Magalhaes M.C.:** Direct Effects of Stress on Adrenocortical Function. *Horm Metab Res.* 1998;30(6-7):464-474
- Piperakis S.M., Petrakou E., Tsilimigaki S.:** Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2000;36(3):243–249
- Plotsky P.M., Thrivikraman K.V., Meaney M.J.:** Central and feedback regulation of hypothalamic corticotropin-releasing factor secretion. *Ciba Found Symp.* 1993;172:59-75; discussion 75-84
- Plotsky P.M., Owens M.J., Nemeroff C.B.:** Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am.* 1998;21(2):293-307
- Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F.:** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:1499-1503
- Potter E., Sutton S., Donaldson C., Chen R., Perrin M., Sawchenko P.E., Vale W.:** Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8777–8781
- Pratt L.A., Ford D.E., Crum R.M., Armenian H.K., Gallo J.J., Eaton W.W.:** Coronary Heart Disease/Myocardial Infarction: Depression, Psychotropic Medication, and Risk of Myocardial Infarction: Prospective Data From the Baltimore ECA Follow-up. *Circulation.* 1996;94(12):3123-3129

- Pullar J.M., Vissers M.C.M., Winterbourn C.C.:** Glutathione Oxidation by Hypochlorous Acid in Endothelial Cells Produces Glutathione Sulfonamide as a Major Product but Not Glutathione Disulfide. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22120-22125
- Rivier J., Gulyas J., Kirby D., Low W., Perrin M.H., Kunitake K., DiGrucchio M., Vaughan J., Reubi J.C., Waser B., Koerber S.C., Martinez V., Wang L., Taché Y., Vale W.:** Potent and Long-Acting Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor 2 Selective Peptide Competitive Antagonists. *J Med Chem* 2002; 45(21):4737-4747
- Rosengren A., Hawken S., Öunupuu S., Sliwa K., Zubaid M., Almahmeed W.A., Blackett K.N., Sitthi-amorn C., Sato H., Yusuf S, for the INTERHEART investigators:** Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438): 953-962
- Ross R., Glomset J.A.:** Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180(93):1332–1339
- Ross P.C., Kostas C.M., Ramabhadran T.V.:** A variant of the human corticotrophin-releasing factor (CRF) receptor: cloning, expression and pharmacology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(3):1836-1842
- Ross R.:** Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138(5 Pt 2):S419-S420.
- Rückert Y., Rhode W., Furkert J.:** Radioimmunoassay of Corticotropin Releasing Hormone. *Exp Clin Endocrinol.* 1990;96(2):129-137
- Rudisch B., Nemeroff C.B.:** Epidemiology of Comorbid Coronary Artery Disease and Depression. *Biol Psychiatry.* 2003;54(3):227–240
- Sanchez-Campos S., Tunon M.J., Gonzalez P., Gonzalez-Gallego J.:** Oxidative stress and changes in liver antioxidant enzymes induced by experimental dicroceliosis in hamsters. *Parasitol Res.* 1999;85(6):468-474

- Sawchenko P.E., Brown E.R., Chan R.W.K., Ericsson A., Li H.Y., Roland B.K., Kovacs K.J.:** The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res.* 1996;107:201-222
- Sen C.K.:** Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochemical Pharmacology* 1998;55:1747-1758
- Senft A.P., Dalton T.P., Shertzer H.G.:** Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 2000;280(1):80-6
- Serebruany V.L., Glassman A.H., Malinin A.I., Nemeroff C.B., Musselman D.L., van Zyl L.T., Finkel M.S., Krishnan R.R., Gaffney M., Harrison W., Califf R.M., O'Conner C.M.; for the SADHART Study Group:** Platelet/Endothelial Biomarkers in Depressed Patients Treated With the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Sertraline After Acute Coronary Events. *Circulation.* 2003;108(8):939-944
- Shao R., Guo X.:** Human microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase catalytic protein: a model for the study of in vitro angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(4):788-794
- Shi M.M., Kugelman A., Icamoto T., Tian L., Forman H.J.:** Quinone- induced oxidative stress elevates glutathione and induces γ -glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem.* 1994;269(42):26512-26517
- Sies H.:** Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;27(9/10):916-921
- Sies H.:** Oxidative stress: introductory remarks. In: *Oxidative Stress.* edited by Sies H. New York: Academic, 1985, p. 1–8.
- Sies H.:** Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London: Academic, 1991.
- Smagin G.N., Dunn A.J.:** The role of CRF receptor subtypes in stress-induced behavioural responses. *Europ J Pharmacol.* 2000;405(1-3):199-206
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.:** Measurement of protein using bicinononic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85
Erratum in *Anal Biochem.* 1987;163(1):279

- Söderdahl T., Enoksson M., Lundberg M., Holmgren A., Ottersen O.P., Orrenius S., Bolcsfoldi G., Cotgreave I.A.:** Visualiazation of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *Faseb J* 2003;17(1):124-126
- Stary H.C.:** Changes in the cells of atherosclerotic lesions as advanced lesions evolve in coronary arteries of children and young adults, in: S. Glagov, W.P. Newman, S.A. Scaffer(Eds.), *Pathobiology of the Human Atherosclerotic Plaque*, Springer, New York, 1990, pp. 93–106.
- Steinberg D., Witztum J.L.:** Lipoprotein, lipoprotein oxidation, and atherogenesis, in: K.R. Chien K.R (Ed.), *Molecular Basis of Cardiovascular Disease*, Saunders, Philadelphia 1999, pp. 458–475
- Stenzel P., Kersterson R., Yeung W., Cone R.D., Rittenberg M.B., Stenzel-Poore M.P.:** Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. *Mol Endocrinol.* 1995;92(5):637-645
- Stocker R., Keaney J.F. Jr.:** Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 2004;84:1381-1478
- Strike P.C., Steptoe A.:** Psychosocial Factors in the Development of Coronary Artery Disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2004;46(4):337-347
- Ströhle A., Holsboer F.:** Stress Responsive Neurohormones in Depression and Anxiety. *Pharmacopsychiatry.* 2003;36(Suppl.3):S207-S214
- Suntres Z.E.:** Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology.* 2002;180(1):65-77
- Szasz Th., Thakali K., Fink G.D., Watts S.W.:** A comparison of Arteries and Veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function, and disease. *Biol. Med* 2007;232:27-37
- Takenaka A., Annaka H., Kimura Y., Aoki H., Igarashi K.:** Reduction of Paraquat-induced Oxidative Stress in Rats by Dietary Soy Peptide. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(2):278-283
- Thomas A.J., Kalaria R.N., O'Brien J.T.:** Depression and vascular disease: what is the relationship? *J Affect Disord.* 2004;79(1-3):81–95
- Tietze F.:** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized GSH. Application to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969;27:502-522

- Tsukamoto M., Tampo Y., Sawada M., Yonaha M.:** Paraquat-Induced Oxidative Stress and Dysfunction of the Glutathione Redox Cycle in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;178(2):82-92
- Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J.:** Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science.* 1981;213(4514):1394-1397
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M., Telser J.:** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007;39:44-84
- Von Känel R., Mills P.J., Fainman C., Dimsdale J.E.:** Effects of Psychological Stress and Psychiatric Disorders on Blood Coagulation and Fibrinolysis: A Behavioral Pathway to Coronary Artery Disease? *Psychosom Med.* 2001;63(4):531-544
- Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G.:** Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension.* 2004;44(4):381-386
- Wilbert-Lampen U., Trapp A., Modrzik M., Fiedler B., Straube F., Plasse A.:** Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: A potential link between stress and endothelial dysfunction? *Journal of Psychosomatic Research* 2006;61:453-460
- Wilbert-Lampen U., Straube F., Trapp A., Deutschmann A., Plasse A., Steinbeck G.:** Effects of corticotropin-releasing Hormone (CRH) on monocyte function, mediated by CRH-receptor subtype R1 and R2. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 2006;47:110-116
- Xu Y., Swerlick R.A., Sepp N., Bosse D.C., Ades E.W., Lawley T.J.:** Characterization of Expression and Modulation of Cell Adhesion Molecules on an Immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Line (HMEC-1). *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):833-837
- Yehuda R.:** Biology of Posttraumatic Stress Disorder. *J Clin Psychiatry.* 2001;62(suppl 17):41-46

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Fiedler
 Vorname: Barbara Stefanie
 Geburtsdatum: 18.02.1979
 Geburtsort: Freudenstadt
 Anschrift: Durschstrasse 64
 78628 Rottweil
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985 bis 1989 Grundschule Dunningen in Seedorf
 1989 bis 1998 Leibniz-Gymnasium, Rottweil

Hochschulbildung:

1998 bis 2000 Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studiengang
 Medizin
 2000 Ärztliche Vorprüfung
 2000 bis 2004 Ludwig-Maximilians-Universität München, Studiengang
 Medizin
 2001 bis 2007 Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
 des Klinikums Großhadern bei Prof. Dr. med. G. Steinbeck
 über „Die CRH-Rezeptoren-vermittelte Wirkung von CRH
 auf das GSH-GSSG-Redoxsystem von Endothelzellen“
 2001 Famulatur in der Inneren Medizin Klinikum Großhadern
 2001 Famulatur in der Chirurgie des Kreiskrankenhauses Rottweil
 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 Famulatur in der Kardiologie / Kardiochirurgie des
 Tansania Heart Institute Dar-es-Salaam, Tansania
 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2003 bis 2004	Praktisches Jahr: Innere Medizin: Universitätsspital Bern, Schweiz Psychiatrie: Universitätsspital Bern, Schweiz Chirurgie: Universitätsspital Bern, Schweiz
2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit:

2005 bis 2006	Psychiatrische Poliklinik des Universitätsspitals Bern, Schweiz
2006 bis aktuell	Klinik und Poliklinik für Radio-Onkologie des Universitätsspitals Bern, Schweiz

Berufliche Nebentätigkeiten:

1996 bis aktuell	ehrenamtliche Arbeit im Katastrophenschutz des Deutschen Roten Kreuzes, Ortsverein Rottweil
1998 bis 2003	zusätzlich Mitarbeit als Rettungssanitäterin im Rettungsdienst des Kreisverbandes Rottweil des Deutschen Roten Kreuzes

12. Danksagung

Während der Experimentier-, Auswertungs- und Schreibzeit meiner Doktorarbeit erfuhr ich von zahlreichen Personen Unterstützung. Stellvertretend für viele möchte ich mich bei einigen ganz besonders bedanken.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Gerhard Steinbeck. Er ermöglichte mir ein selbständiges Arbeiten und die Durchführung aller Experimente, die ich zur Überprüfung meiner Ideen benötigte.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Frau Dr. med. Ute Wilbert-Lampen für die Betreuung meiner Arbeit und ihren Einsatz bei der Korrektur dieser Dissertation.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Bilzer bedanken. Mit seiner Hilfe, konstruktiven Kritik, seinen Kommentaren und Anregungen trug er zum Gelingen der Doktorarbeit bei. Seine Erfahrung und sein Wissen gab er als Rat an mich weiter.

Den Medizinisch-Technischen-Assistentinnen unseres Labors möchte ich für die freundliche Hilfe in fachlichen Fragen danken. Insbesondere Frau Andrea Plasse und Frau Ingrid Liß, die mir mit ihrer Geduld sowohl bei der praktischen Tätigkeit im Labor als auch bei gelegentlichen Problemen zur Seite standen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Mann Christos Loupatatzis und bei meiner Mutter für ihre große Zuversicht und ihren unerschütterlichen Glauben in mich und meine Doktorarbeit bedanken. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich noch allen meinen Freundinnen und Freunden danken, die sich trotz Stress im eigenen Berufsleben Zeit genommen haben, immer für mich da zu sein und mir bei der Korrektur dieser Arbeit zu helfen.